ÜBER DIE WIRKUNGEN AMPHIPHILER PHARMAKA AUF DIE MECHANISCHE BELASTBARKEIT UND VERFORMBARKEIT INTAKTER ERYTHROZYTEN

Reinhard Naar

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Forth

ÜBER DIE WIRKUNGEN AMPHIPHILER PHARMAKA AUF DIE MECHANISCHE BELASTBARKEIT UND VERFORMBARKEIT INTAKTER ERYTHROZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Reinhard Naar
aus
Trostberg

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Remien
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Forth
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung	3. Juni 1986

MEINER MUTTER GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODIK (gemeinsamer Teil)	10
DISKUSSION DER METHODIK	25
VERSUCHSAUFBAU DER ULTRASCHALLMETHODE	27
ERGEBNISSE DER ULTRASCHALLMETHODE	30
Hämoglobinfreisetzung in Abhängigkeit von der Beschallungszeit	30
Einfluß der Osmolarität des Suspensiosmediums	31
Einfluß von Chlorpromazin	34
Einfluß von Natrium-dodecylsulfat	35
Einfluß von Stickstoff-Lost	38
Einfluß der Viskosität des Mediums	39
VERSUCHSAUFBAU DER SCHERKRAFTMETHODE	43
ERGEBNISSE DER SCHERKRAFTMETHODE	47
Hämoglobinfreisetzung in Abhängigkeit vom Druckgradienten	47
Einfluß der Osmolarität des Suspensionsmediums	51
Einfluß der Aufbewahrungsdauer von Erythrozyten	53
Einfluß von Dinatrium-Äthylendiamintetraessigsäure	56
Einfluß von Chlorpromazin	58
Einfluß von Chlorpromazin-Methojodid	63
Einfluß von Natrium-dodecylsulfat	64
Einfluß von Na-Thiopental	66
Einfluß von Thiazinamium	67
VERSUCHSAUFBAU DER DESORPTIONSMETHODE	68
ERGEBNISSE DER DESORPTIONSMETHODE	72
Einfluß der Osmolarität auf die Passagefähigkeit	72
Einfluß von Chlorpromazin	73
Einfluß von Thiazinamium	76
Einfluß von Albumin	78
DISKUSSION DER ERGEBNISSE	79
Hämolyse durch Ultraschall	79
Hämolyse durch Scherkräfte	82
Viskoelastisches Membranmodell	93
Mechanismen des protektiven Effekts	97
Einfluß der Aufbewahrungsdauer	101
ZUSAMMENFASSUNG	103
LITERATURVERZEICHNIS	105
ANHANG: Tabellen	111
Programme	115

EINLEITUNG

Die Erythrozytenmembran ist ein gut geeignetes Studienobjekt, um einen eventuellen membranexpandierenden Effekt von Pharmaka zu untersuchen. Die hier verwendeten Substanzen beeinflussen die mechanischen Eigenschaften biologischer Membranen. Bei Erythrozyten äußert sich dies z.B. in einem veränderten rheologischen Verhalten. Stabilisierende und destabilisierende Wirkungen auf die osmotische Resistenz von Erythrozyten sind ebenfalls bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß neurotroper und anderer Pharmaka auf die mechanische Belastbarkeit und Verformbarkeit intakter Erythrozyten geprüft.

Rheologie

Erythrozyten sind verantwortlich für die besonderen rheologischen Eigenschaften des Blutes. Dabei kommt den Zellmembranen die größte Bedeutung zu. Im Gegensatz zu Newton'schen Flüssigkeiten ist die Viskosität des Blutes keine fixe Materialeigenschaft, sondern abhängig von den Strömungsverhältnissen, d.h. vom Schergrad

$$\gamma = \frac{dv}{dl}\ sec^{-1};$$

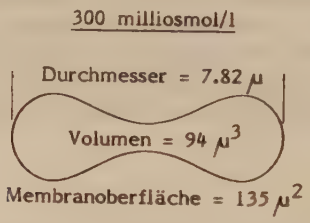
dv ist die Geschwindigkeitsdifferenz an der Länge dl. Bei Messung "nicht-Newton'scher" Flüssigkeiten wird daher eine "scheinbare" Viskosität mit dem zugehörigen Schergrad angegeben. Unter Scher**kraft** versteht man die aufzubringende Schubspannung, die bei einer bestimmten Flüssigkeit eine bestimmte Strömung hervorruft. Die Scherkraft ist proportional zum erzeugten Schergrad:

$$\tau = \eta * \gamma.$$

Der Proportionalitätsfaktor η (=Viskosität) hat die Dimension $N*sec*m^{-2}$, die Scherkraft somit Nm^{-2}.

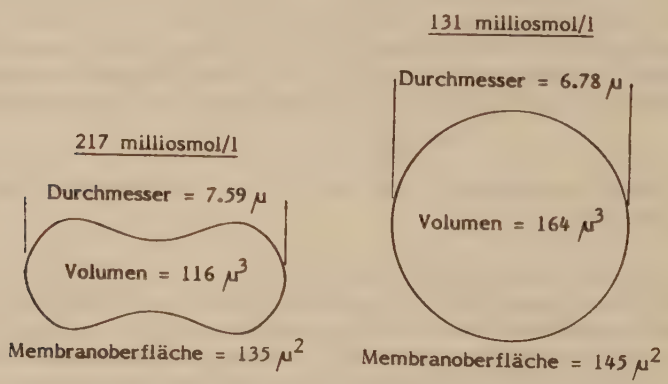
Die Scherkraft wirkt auch auf den Erythrozyten in der Strömung und ist mit dessen Verformung korreliert. Die größten Scherkräfte im Blutkreislauf treten in den Kapillaren auf (18). Dort ist dementsprechend die Verformung am stärksten. Zudem muß der Erythrozyt hier in der Lage sein, Röhren zu durchfließen, deren Durchmesser kleiner sind als sein eigener. Bei hohen Scherkräften wird er in eine langgestreckte Form gezwungen und richtet sich mit der Längsachse parallel zur Strömung aus; dabei paßt sich die Zelle dem paraboloiden Geschwindigkeitsprofil an (57).

Die große Verformbarkeit des Erythrozyten geht auf Membraneigenschaften zurück. Wegen seiner bekannten diskozytären Form besitzt er eine hohe Oberflächenreserve. In isotonem Medium, also bei einer Osmolarität von etwa 300 mOsm, hat der durchschnittliche Erythrozyt nach Evans et al. (22) ein Volumen von 94 μ^3 und eine Membranoberfläche von 135 μ^2. Eine Kugel gleichen Volumens hätte nur eine Oberfläche von 100 μ^2.



Der durchschnittliche Erythrozyt.
Daten aus Evans et al. (22)
und Kabott et al. (36)

In hypotonem Medium bedingt der osmotische H_2O-Einstrom eine Volumenzunahme. Bei Konstanz der Oberfläche nähert sich der Erythrozyt der Kugelform. Weiterer Volumenzuwachs ist dann nur unter Membrandehnung möglich. Dabei kann die Oberfläche um etwa 8% zunehmen, bevor die Membran rupturiert (10, 11, 26)



Erythrozyten in hypotonem Medium.
Daten aus Evans et al. (22)

Im hypertonen Medium schrumpft der Erythrozyt wegen des osmotischen H_2O-Entzugs und nimmt Stechapfelform an. Die Passagefähigkeit solcher Zellen durch enge Filterporen ist nach Schmidt-Schönbein (57) schlechter; am besten sei die Verformbarkeit unter isotonen oder leicht hypotonen Bedingungen.

Erythrozytenmembran

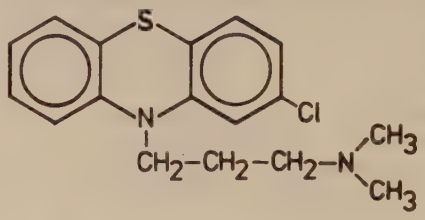
Die 50 bis 120 Å dicke Erythrozytenmembran ist aus Lipoproteiden und Glykoproteiden aufgebaut. Letztere tragen Mukopolysaccharide, die z.B. für die Blutgruppeneigenschaften verantwortlich sind. Den größten Anteil der Membraneiweiße bilden Lipoproteide, die mit Phospholipiden und Glykolipiden verbunden sind. Die Phospholipide orientieren sich größtenteils mit dem polaren Teil zur wässrigen Phase, also zur extra- bzw. intrazellulären Flüssigkeit. Die hydrophoben Fettsäureketten werden durch Van der Waals'sche Kräfte zur Membranmitte hingezogen. Ein kleiner Teil der Phospholipide steht in Interaktion mit globulären Eiweißkörpern, die zufällig über die Membran verteilt sind. Ein "Fluid Mosaic"-Modell von Zellmembranen ist bei Singer et al. (69) beschrieben.

Spektrin liegt an der zytoplasmatischen Seite der Membran und sorgt für deren Zusammenhalt; ohne Spektrin würde der Erythrozyt in kleine Membranvesikel zerfallen (46). Die stabilisierende Funktion eines Netzwerks aus Spektrintetrameren wird bei Ralston (52) diskutiert. Untersuchungen mit entsprechenden Membranmodellen zeigten, daß die bikonkave Form spontan angenommen wird, wenn im Innern des Modells ein Unterdruck erzeugt wird (10, 11).

Pharmaka

Aus mehreren Untersuchungen sind biphasische Einflüsse von Phenothiazinderivaten auf die osmotische Fragilität des Erythrozyten bekannt (54, 62, 63): niedrige Konzentrationen stabilisieren gegen osmotische Hämolyse, bei höheren kehrt dieser Effekt wieder um bis zur Destabilisierung. Anionische Wirkstoffe einerseits sowie kationische und nichtionische andererseits rufen unterschiedliche Veränderungen der Zellform hervor. Die hier angeführten Substanzen gehören bis auf 3 Ausnahmen zu den tertiären oder quarternären Aminen. Thiopental ist ein sekundäres Amin, Natrium-dodecylsulfat ein anionisches Detergens und EDTA ein Chelator für divalente Kationen. Die Beobachtung ihrer Einflüsse auf mechanische Membraneigenschaften dient dem Zweck, den Mechanismus ihrer bekannten Wirkungen auf die Erythrozytenmembran insoweit zu klären, ob ein primär membranexpandierender Effekt verantwortlich sein kann, oder ob oberflächlich adsorbierte Moleküle die mechanischen Membraneigenschaften erst sekundär, also nach erfolgter mechanischer Belastung beeinflussen.

Das Phenothiazinderivat **Chlorpromazin** (CPZ) gilt gemeinhin als Prototyp für die Gruppe der Neuroleptika.



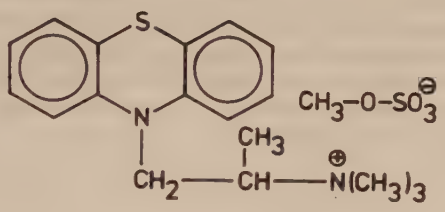
Chlorpromazin

Der elektronegative Substituent in Position 2 erhöht die maximale Wirksamkeit im Vergleich zu Promazin. Die aliphatische Substitution in Position 10 führt zu einer kleineren molaren Wirkungsstärke (nicht aber maximalen Wirksamkeit!) als die Substitution mit einer Piperazingruppe. Als Beispiel diene der Vergleich von Chlorpromazin und Perphenazin: Austausch der Aminopropyl- gegen die Äthanylpiperazinylpropylfunktion erhöht die molare Wirksamkeit um mehr als eine Zehnerpotenz (25). CPZ liegt bei pH 7.4 zur Hälfte in kationischer Form (quarternäres Amin) vor (63, Fig.5).

Von den zentralnervösen Wirkungen von CPZ seien vor allem antipsychotische, sedierende, anxiolytische und antiemetische Eigenschaften hervorgehoben. Das Pharmakon erzeugt eine psychisch indifferente Bewußtseinslage. Am peripheren vegetativen Nervensystem zeigt CPZ parasympatholytische und stärker noch alpha-sympatholytische Aktivität; wie andere Phenothiazine auch antagonisiert es die Effekte von Dopamin, (Nor-)Adrenalin, Acetylcholin, Histamin und Serotonin. Die antihistaminische Wirkung ist im Gegensatz zu Promethazin nur schwach ausgeprägt. Dies ist auf eine strukturisomere Seitenkette zurückzuführen, bei der die Aminogruppe nur durch 2 Kohlenstoffatome vom Stickstoff des Ringsystems getrennt ist (vgl. auch Strukturformel von Thiazinamium). Klinisch unerwünscht sind vor allem Störungen der extrapyramidalen Motorik, der Hämatopoese (z.B. Agranulozytose!) und orthostatische Probleme. Wechselwirkungen z.B. mit Antihypertensiva, zentral dämpfenden Pharmaka und Alkohol sind zu beachten.

Chlorpromazin-Methojodid (CPZ-MJ) zeichnet sich durch Einführen einer dritten Methylgruppe an den Stickstoff der Seitenkette aus; dieser erhält dadurch eine positive Ladung, Jodid ist das korrespondierende Anion. CPZ-MJ findet keine therapeutische Anwendung. Als Phenothiazinderivat mit obligat quarternärem Amin kann es mangels Lipophilie keine zentralen Wirkungen entfalten.

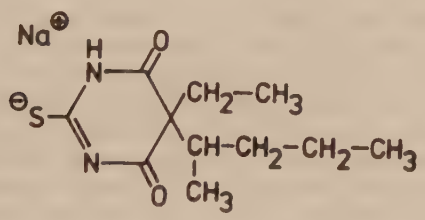
Thiazinamium (Syn.: Methylpromethazin) ist das quarternäre Analogon zum Promethazin.



Thiazinamium-methylsulfat

Der Stickstoff der Seitenkette trägt einen dritten Methylrest und erhält so eine obligate positive Ladung, weswegen keine zentrale Wirksamkeit dieser Substanz besteht. Thiazinamium besitzt antihistaminische und spasmolytische Eigenschaften.

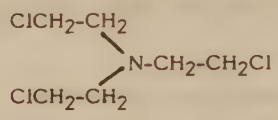
Das Barbiturat **Thiopental** supprimiert die Aktivität erregbarer Membranen.



Thiopental-Natrium

Als injizierbares Kurznarkotikum liegt es als wasserlösliches Natriumsalz unter Zusatz von Na_2CO_3 vor. Die injizierte Lösung wird im Blut sofort neutralisiert und die so entstandene lipophile Form sorgt für Bewußtseinsverlust in wenigen Sekunden. Der anschließende Übergang der Wirksubstanz aus dem Plasma in andere Kompartimente (vor allem Fettgewebe) erklärt die relativ kurze Wirksamkeit von ca. 20 bis 30 min nach einmaliger Injektion einer geeigneten Dosis. Thiopental ist in der Lipidphase biologischer Membranen gut löslich. Es bietet sich daher als Testsubstanz für eine eventuelle expandierende Wirkung auf die Erythrozytenmembran an.

2,2',2''-Trichlor-triäthylamin (HN3, trifunktionales Stickstoff-Lost) gibt im Organismus Alkylgruppen an Aminosäuren, Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren, intrazelluläre und membranständige Proteine ab. Besonders betroffen ist stark proliferierendes Gewebe, wo Mutationen bzw. Zelltod verursacht werden. HN3 wird gut über Augen, Haut, Respirationstrakt und Magen-Darm-Kanal resorbiert. Wegen dieser Eigenschaften wurden Lostverbindungen für militärische Zwecke mißbraucht. Die perkutane letale Dosis beim Menschen beträgt etwa 10 bis 20 mg/kg. Systemische Vergiftungen können lebenslange psychische und organische Schäden nach sich ziehen.

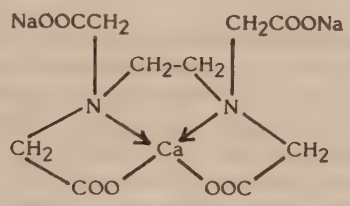


Die Angaben über HN3 wurden Klimmek et al. (38) entnommen. Die Alkylierung durch HN3 geht mit einer Vernetzung von Membranproteinen einher und hat somit eine Rigidifizierung der Erythrozytenmembran zur Folge. Wegen seiner relativ spezifischen Wirkung auf Spektrin (76) wurde HN3 bei der unten beschriebenen Ultraschallmethodik verwendet. Es läßt sich dadurch prüfen, inwieweit Veränderungen von mechanischen Membraneigenschaften von der Meßmethodik erfaßt werden.

Natrium-dodecylsulfat ($C_{12}H_{25}NaO_4S$; SDS) findet in der Pharmazie als Emulgator Verwendung; selbstemulgierende Grundlagen werden z.B. zusammen mit Cetylstearyl-Alkoholen bereitet (45). SDS kann mit seinem Alkylrest in die Membranlipidphase eindringen, wegen der polaren Sulfatgruppe aber nicht durchdiffundieren. Die Substanz wird sich daher bevorzugt an der Grenzfläche Membran/Extrazellulärraum verteilen. Auch die anionische Substanz SDS stabilisiert in niedrigen und destabilisiert in höheren Konzentrationen gegen osmotische Hämolyse (Remien, unveröffentlichte Daten, Walther Straub Inst. für Pharmakologie und Toxikologie, München).

Äthylen-diamin-tetraessigsäure (EDTA) bindet divalente (z.B. Ca^{++}) und trivalente Kationen in Form stabiler Chelate. Die Substanz findet Anwendung z.B. bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen (Wirksamkeit zweifelhaft!), Sklerodermie, Digitalisüberdosierung, Verätzung der Hornhaut des Auges mit $CaCO_3$, als Stabilisator in Injektions- bzw. Infusionslösungen und als Antikoagulans in vitro. Weiterhin hat sich EDTA bei bestimmten Schwermetallintoxikationen bewährt. Dies gilt insbesondere für Blei, aber auch für Cadmium, Chrom und Plutonium, nicht jedoch für Quecksilber: Trotz Chelatbildung in vitro ist EDTA nicht als Antidot geeignet, da die Bindung dieses Schwermetalls an SH-Gruppen im Organismus stabiler ist. Rasche intravenöse Injek-

tion von Na_2-EDTA kann eine hypocalcämische Tetanie hervorrufen. Zur parenteralen Therapie wird daher $CaNa_2$-EDTA benutzt, da es in dieser Form den Kalziumspiegel kaum stört; es wird aber über Nephrotoxizität (Schädigung der Tubuli) berichtet (vgl. z.B. 29). EDTA wurde für die vorliegende Arbeit gewählt, da es das sog. "resealing" verhindern kann. Diese Fähigkeit der Erythrozytenmembran, entstandene "Membranlecks" wieder zu schließen, erfordert die Anwesenheit divalenter Kationen (35).



Ca-Chelat von Dinatrium-EDTA

Membran und Pharmaka

Um eine eventuelle membranexpandierende Wirkung neurotroper Pharmaka zu untersuchen, wurde die Erythrozytenmembran wegen ihrer problemlosen Verfügbarkeit gewählt. Da der schichtweise Aufbau biologischer Membranen (hydrophil/lipophil/hydrophil) grundsätzlich übereinstimmt, kann sie als Modell für Untersuchungen mit den angeführten Pharmaka dienen. Es ist unklar, ob die Membranexpansion für die elektrophysiologisch stabilisierende Wirkung entscheidend ist. Bull et al. (12) beobachteten Membranexpansion bei anästhesierend wirkenden Alkoholen in gleichem Ausmaß wie bei unwirksamen. Dies führte sie zur Annahme, daß Membranexpansion eher ein zufälliger Nebeneffekt, nicht aber notwendig für die anästhesierende Wirkung sei.

Demgegenüber behaupten Mori et al. (48), daß für die Tiefe der Anästhesie die Größe des positiven Volumenexzesses entscheidend sein müsse. Volumenexzess ist definiert als Volumendifferenz des Systems Anästhetikum plus Lösungsmittel zur Summe der Einzelvolumina. Er ist negativ, wenn das Wirkstoffmolekül im Lösungsmittel komprimiert wird, wie die genannten Autoren dies für Enfluran, Isofluran und Halothan feststellten. Ein positiver Volumenexzess um etwa 10% wurde dagegen bei Lösung dieser Pharmaka in nichtpolaren Lösungsmitteln angegeben; der Volumenexzess von Enfluran bei Phospholipid-Vesikeln in wässriger Suspension sei ebenfalls positiv. Biologische Membranen hingegen expandieren nach Seeman (62) durch Eindiffusion von Anästhetika etwa zehnmal mehr, als dies durch das Van-der-Waals-Volumen der Wirkstoffmoleküle erklärt werden kann.

Die Wirkung von Pharmaka an der Erythrozytenmembran kann auf verschiedene Weise beobachtet werden. Der antihämolytische Effekt z.B. bezeichnet eine Verminderung der osmotischen Hämolyse. Bei Seeman (62) finden sich Angaben über die antihämolytische Wirksamkeit von über 100 neurotropen Pharmaka. Die Annahme einer membranexpandierenden Wirkung kann den Effekt durch Vergrößerung der Oberflächenreserve erklären. Damit ist aber noch nicht gesagt, ob die Expansion primär (d.h. aktiv) oder erst nach mechanischer Belastung erfolgt.

Weiterhin induzieren amphiphile neurotrope Pharmaka Formänderungen an Erythrozyten (4, 7, 21, 30, 42, 47, 59, 67). Anionische Moleküle bilden stechapfelartige ("crenated") Zellformen (Echinozyten), kationische und neutrale dagegen Stomatozyten ("cup shapes"); die Formveränderungen sind nach Auswaschen des Pharmakons größtenteils reversibel; es besteht ein Antagonismus zwischen Echinozyten- und Stomatozytenbildnern (21, 47, 67). Die Formeffekte werden mit bevorzugter Eindiffusion in die äußere (→Echinozyten) bzw. innere (→Stomatozyten) Membranschicht begründet (67), da selektive Expansion nur einer Schicht Krümmung hervorruft. Dies erklärt zwar den Antagonismus, nicht aber die Frage, warum ausgerechnet Stechäpfel bzw. Stomatozyten entstehen. Solche pharmakoninduzierten Formveränderungen werden von Seeman in seiner Übersichtsarbeit (62) als Argument für aktive (also spontane, mechanische Belastung nicht voraussetzende) Membranvolumenexpansion herangezogen.

Dagegen fanden Conrad et al. (19, 20), daß Chlorpromazin und Chlorpromazin-Methojodid nur in nicht signifikantem Ausmaß an die Erythrozytenmembran gebunden werden. Die tatsächliche Löslichkeit amphiphiler Moleküle in den meisten Biomembranen sei um etwa 3 Zehnerpotenzen kleiner als in Phospholipid-Vesikeln; ein größerer "innerer Druck" in der Lipidphase schließe amphiphile Substanzen von der Eindiffusion aus. Diese Aussage stimmt überein mit den Arbeiten von Bondy et al. (6) und Leterrier et al. (43), wo ein Eindringen von CPZ in die Lipidphasen von Membranen in pharmakologisch relevantem Ausmaß verneint wird. Leterrier et al. vermuten, daß CPZ die Grenzfläche zwischen Phospholipiden und Membranproteinen bevorzugt, Bondy et al. sprechen hingegen von Lokalisation an der Membran/Wasser-Grenzfläche.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist der Einfluß der oben beschriebenen Pharmaka auf die mechanischen Eigenschaften der Erythrozytenmembran. Die Membran wurde zu diesem Zweck einerseits mechanischer Belastung durch Ultraschall und Scherkräfte in engen Kanälen ausgesetzt. Zum anderen wurde die Filtrierbarkeit von Erythrozytensuspensionen niedrigen Hämatokrits getestet. Es wird versucht, die Ergebnisse mit Hilfe eines viskoelastischen

Membranmodells zu deuten, um zur Diskussion über eine eventuelle primäre oder sekundäre (aktive oder passive) Membranexpansion beizutragen. "Primäre" oder "aktive" Membranexpansion beinhaltet, daß Wirkstoffmoleküle in die Membranphase eindiffundieren und eine Zunahme des Membranvolumens verursachen. "Sekundäre" oder "passive" Membranexpansion setzt eine tangentiale Belastung voraus, die den Eintritt von Molekülen in die Membran erst ermöglicht.

MATERIAL UND METHODIK (gemeinsamer Teil)

In diesem Abschnitt werden nur das Material und die Methodik beschrieben, die den drei Verfahren Ultraschallbehandlung, Scherkraftexposition und Desorptionsmethode gemeinsam sind. Die spezielle Methodik findet in eigenen Kapiteln Erwähnung, die den jeweiligen Ergebnissen vorangestellt sind.

Suspensionsmedien

Als gepuffertes Medium zum Waschen von Erythrozyten und zur Herstellung einer Zellsuspension mit einem definierten Hämatokrit diente Parpat's (nur bei einem Teil der Ultraschallversuche) bzw. bei den anderen Versuchen "Phosphate Buffered Saline" (PBS).

Zur Herstellung von PBS wurden zunächst 0.4 molare Lösungen von Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 bereitet. Hiermit wurde dann eine 0.4 molare Pufferlösung auf pH 7.4 eingestellt. Die pH-Messung erfolgte mit einer Glas-Elektrode (Knick Digital pH-Meter, Typ 641). 25 ml Puffer und 9 g NaCl wurden dann mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Danach folgte noch die Bestimmung der Osmolarität nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung mit dem Osmometer von Knauer, Typ Nr.7. Die Meßwerte schwankten zwischen 305 und 320 mosmol/l. Für die Herstellung von Puffer- und Wirkstofflösungen fand Aqua ad injectabilia Verwendung. Bei den Versuchen mit den 3µ dicken Filterkanälen wurde auch Aqua tridestillata benutzt, nachdem es mit Filtern von 0.8µ Porendurchmesser gereinigt worden war.

Herstellung der Suspensionen

Zur Gewinnung des Substrats für die Untersuchungen fanden neben Venenblut verschiedener Spender frische ACD-Konserven Verwendung, aber auch solche, die das Verfallsdatum bereits erheblich (bis zu 3 Monaten) überschritten hatten.

Das entnommene Blut wurde durch Zentrifugation bei 5000 U/min, Absaugen des Überstands und anschließende Zugabe von Puffer dreimal gewaschen und das zuletzt gewonnene Zellkonzentrat auf einen Hämatokrit von ungefähr 10 mit Puffer verdünnt. Der genaue Wert wurde dann mit Hilfe der Hämatokrit-Zentrifuge (Hämofuge, Heraeus) bei 12'000 U/min bestimmt, um schließlich durch nochmalige Verdünnung mit Puffer eine Suspension mit Hämatokrit 1% bzw. 2% herzustellen.

Pharmaka

Die allgemeinen Eigenschaften der benutzten Pharmaka sind bereits in der Einleitung beschrieben. Im einzelnen fanden folgende Stoffe Verwendung:

Chlorpromazin·HCL	Serva, Heidelberg
Chlorpromazin-methojodid	hergestellt im Hause, Lab. Wildenauer
Thiazinamium-methylsulfat	Bayer, Leverkusen
Thiopental-Na	Byk Gulden, Konstanz
2,2´,2´´-Trichlor-triäthylamin (HN3)	Ega-Chemie (jetzt Aldrich), Steinheim
Na_2-äthylendiamintetraessigsre. (EDTA)	Merck, Darmstadt
Na-dodecylsulfat (SDS)	Bio·Rad, Richmond, Calif.
Hydroxyäthylstärke (HÄS)	Fresenius, Oberursel/Ts

Einstellung der Wirkstoffkonzentrationen

Ausgehend von der höchsten im Probenmedium herzustellenden Konzentration wurde zunächst eine 100-fach stärkere wäßrige Lösung des Pharmakons zubereitet. Soweit die Wägegenauigkeit es erforderte, geschah dies auch über den Umweg einer noch höheren Konzentration und anschließendes Verdünnen.

Mit dieser Ausgangslösung wurde dann eine Verdünnungsreihe hergestellt, deren Werte dementsprechend um den Faktor 100 größer als die gewünschten Endkonzentrationen waren. Diese wurden dann erreicht, indem 10 µl aus der Verdünnungsreihe zu 1 ml Probensuspension hinzupipettiert wurden.

Leerwertproben erhielten das gleiche Volumen Wasser. Der Volumenfehler von 1% konnte dabei vernachlässigt und aus entsprechendem Grund auch auf die Pufferung der Wirkstoffverdünnungen verzichtet werden.

Bestimmung des intrazellulären Hämoglobins

Das freigesetzte Hämoglobin wurde nach Zentrifugation der Proben mit 11'600 U/min (Beckman Microfuge, Modell 152) durch seine Extinktion gegen Wasser bei 540 nm im Zeiss-Photometer (Typ PMQ 3) bestimmt. Ein Blindwert Wasser gegen Wasser mußte als Küvettenfehler von der Extinktion der Probe subtrahiert werden.

Die Hämoglobinfreisetzung diente bei der Ultraschall-Hämolyse und bei der Scherkraftmethode als Maß für die mechanische Schädigung der Zellen. Berechnet und in Abhängigkeit vom schädigenden Agens graphisch dargestellt wurde die intrazellulär verbliebene Hämoglobinfraktion nach der Gleichung

$$Y = 100 * (1-E/H).$$

Y = Prozent intrazelluläres Hämoglobin
E = Extinktion des Filtrats
H = Extinktion der vollständig hämolysierten Probe (=Standard)

Kurvenanpassung: einfache e-Funktion

Für die Abnahme des intrazellulären Hämoglobins zeigte sich eine reproduzierbare nichtlineare Abhängigkeit von wachsender Beschallungszeit bzw. vom steigenden Druckgradienten im Porenkanal. An die Meßwerte konnte eine e-Funktion vom Typ

$$Y = Ao * e^{-a*x}$$

angepaßt werden. Die Ordinate (Y) repräsentiert hierbei das intrazellulär verbliebene Hämoglobin in Prozent des als Erythrozytensuspension zur Beschallung bzw. Filtration gebrachten gesamten Hämoglobins. Auf der Abszisse (x) ist die Beschallungszeit in Sekunden bzw. der Druckgradient in mm Hg aufgetragen.

Der Ausgangswert Ao entspricht der Kontrolle ohne Beschallung bzw. Filterpassage. Er wird dann kleiner als 100% sein, wenn z.B. durch hämolytischen Effekt der untersuchten Substanz oder durch hypotones Medium bereits Hämoglobin freigesetzt wird. Die Differenz zu 100% zeigt daher den von der mechanischen Belastung unabhängigen Anteil der Hämolysierung (vgl. hierzu auch "Ausschaltung der Vorhämolyse").

Der Koeffizient a des Exponenten ist ein Maß für die Empfindlichkeit der untersuchten Zellpopulation gegen mechanische Belastung. Nach Berechnung von

$$T_{1/2} = -\ln(2)/a$$
bzw. $$P_{1/2} = -\ln(2)/a$$

kann eine Halbwertszeit (bzw. ein Halbwertsdruck) angegeben werden, die (bzw. der) die Hälfte der ursprünglich eingebrachten Zellen zerstört (siehe hierzu Abb.2 bzw. 10).

Kurvenanpassung: doppelte e-Funktion

Wie im folgenden gezeigt wird, ist das Ein-Kompartiment-Modell bei allen Ultraschallversuchen gültig. Bei den Versuchen mit variablem Druckgradienten am Filter befriedigte die Anpassung an eine einfache e-Funktion allerdings nur bei relativ flachen Kurvenverläufen, d.h. wenn beim höchsten erzeugten Druckgradienten (500 mm Hg) das intrazelluläre Hämoglobin die 50%-Marke nicht wesentlich unterschritt, was vor allem bei Kontrollblut im isotonen Medium der Fall war (Abb.10).

Unter destabilisierenden Bedingungen hingegen erfolgte bei Annahme einer einfachen e-Funktion ein zu steiler Abfall im Druckbereich unter 100 mm Hg, darüber ein zu flacher (siehe Ergebnisse der Scherkraftmethode). Bessere Ergebnisse erbrachte dann die Anpassung an eine doppelte e-Funktion der Form

$$Y = Ao * e^{-a*x} + Bo * e^{-b*x}.$$

Y	=	Prozent intrazelluläres Hämoglobin
Ao, Bo	=	zur Beschallung bzw. Filtration eingebrachtes intrazelluläres Hämoglobin, die Subpopulation A oder B betreffend
a, b	=	Koeffizient im Exponenten; bezeichnet die Empfindlichkeit der jeweiligen Subpopulation gegen Ultraschall bzw. Scherkräfte

Dieses Modell beschreibt zwei Subpopulationen (A und B) in der untersuchten Erythrozytensuspension. Die angepaßten Parameter Ao und Bo geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Subpopulation an, deren unterschiedliche Empfindlichkeit gegen mechanische Belastung wiederum durch die Koeffizienten a bzw. b angezeigt wird. Der Ausdruck 100% - Ao - Bo ergibt die von der mechanischen Belastung unabhängige Vorhämolyse (vgl. einfache e-Funktion). Beispiele für doppelte e-Funktionen zeigen Abb.10 (überalterte ACD-Konserve) und 8 (Daten mit 11 cP Viskosität).

Kurvenanpassung: das Rechnerprogramm

Die gesuchten Parameter der einfachen und der doppelten e-Funktion wurden aus den Meßwerten mit Hilfe eines Rechnerprogramms auf der Grundlage des Gauss-Newtonschen Iterationsverfahrens berechnet. Hierzu mußten erst Näherungswerte gefunden werden, was bei einer einfachen e-Funktion leicht durch Logarithmieren und lineare Regression möglich ist.

Bei der doppelten e-Funktion wurden zur ersten Näherung zunächst nur Meßwerte aus dem flachen Kurventeil (längere Beschallungsdauer bzw. höhere Druckwerte) herangezogen. Die senkrechten Abstände zwischen der so ermittelten Funktion und den Werten aus dem steilen Kurventeil dienten als Stützpunkte für die Regressionsrechnung der zweiten Funktion. Die Aufteilung der Meßpunkte in steilen und flachen Teil erfolgte gemäß der kleinsten Summe der Fehlerquadrate.

Das Iterationsverfahren selbst wird bei Pfeffer (51) und Krüger-Thiemer et al. (39) ausführlich beschrieben. Es benutzt Hartley's Modifikation der Gauss-Newtonschen Methode. Dieses least square Verfahren ermittelt mit Hilfe der partiellen Ableitungen in jeder Iteration einen Vektor der Verbesserungen für die geschätzten Parameter. Hartleys Korrekturverfahren, modifiziert nach Metzler, soll diesen Vektor mit Hilfe eines quadratischen Interpolationsverfahrens verbessern und so die Konvergenz beschleunigen bzw. "in manchen Fällen erst ermöglichen" (51).

Mit zunehmender Güte der Anpassung muß die Summe der Abweichungsquadrate einem Minimum zustreben. Ändert sich die Streuung im Vergleich zur vorangegangenen Iteration um einen genügend kleinen Faktor (10^{-4} bis 10^{-6} erschienen praktikabel), kann abgebrochen werden.

Da nichtlineare Regressionsverfahren mehrere Fehlerminima erbringen können, erscheint ein Test auf Nebenminima geboten: Die "Lattice Search"-Routine ändert im Anschluß an die Gauss-Newton-Iterationen alle Schätzparameter um den ±-zehnfachen Wert des zugehörigen 95%-Konfidenz-Intervalls in 200 Teilschritten und prüft auf eine Parameterkonstellation, die geringere Restvarianz, also bessere Anpassung ergibt.

Das in der vorliegenden Arbeit benutzte Rechnerprogramm (Ausdruck im Anhang) wurde in Basic speziell für die hier beschriebene Auswertung in Anlehnung an Pfeffer (51) erstellt. Es wurden Fehlerausgänge geschaffen, z.B. für Matrix-Singularität, zu große oder zu kleine Zahlen usw. Eine ALGOL-Version des Gauss-Newtonschen Iterationsverfahrens findet sich bei Krüger-Thiemer et al. (40).

Streuung - Signifikanz

Das Rechnerprogramm liefert auch die Standardabweichung für die 2 bzw. 4 Schätzparameter. Da die Anzahl der Stützpunkte mit Blick auf die Anpassung an eine einfache e-Funktion gering gehalten wurde, ergibt sich für die Parameter der doppelten e-Funktion ein entsprechend hohes Streuungsmaß: Ein

großer Teil der Versuche lieferte 6 Stützpunkte, was bei 4 anzupassenden Parametern 2 Freiheitsgraden entspricht. Bei den Messungen mit variablem Druckgradienten im Filterkanal existieren sogar solche mit nur 4 Stützpunkten. Mit diesen läßt sich das Anpassungsverfahren an 4 Parameter zwar grundsätzlich durchführen, wegen 0 Freiheitsgraden aber keine Streuung berechnen.

Die geringe Zahl der Stützpunkte hatte allerdings zur Folge, daß das angenommene Modell der doppelten e-Funktion durch die Meßpunkte in den meisten Fällen nicht bestätigt werden konnte, da Signifikanz zweier Parameter gegen 0 Voraussetzung dafür ist, die Existenz eines Kompartiments annehmen zu können.

Verfehlt der Koeffizient a des Exponenten der Funktion die Signifikanz, dann kann er nicht als von 0 verschieden angesehen werden, der Ausdruck

$$e^{-a*x}$$

wird gleich 1 und es bleibt dann nur noch Y = Ao als Abszissenparallele übrig. Wird Ao nicht signifikant, so kann das gesamte Kompartiment

$$Ao * e^{-a*x}$$

nicht durch die Meßpunkte bestätigt werden. Es bleibt dann eventuell nur das andere Kompartiment mit den Parametern Bo und b, mit welchen ebenso zu verfahren ist.

Sind hingegen beide Kompartimente signifikant von 0 verschieden, so muß geprüft werden, ob sie auch tatsächlich zwei verschiedene Kompartimente darstellen, d.h. ob ihre Parameter a und b gegeneinander signifikant sind.

Berechnung der Medianwerte und des Interquantilsbereichs

Der Median wurde in der vorliegenden Arbeit dem arithmetischen Mittel wegen seiner Robustheit gegen "Ausreißer" vorgezogen. Als Streuungsmaß diente der Bereich zwischen den Quantilen p=0.25 und p=0.75, in dem definitionsgemäß 50% der Beobachtungen liegen. Außerdem offenbart die Lage des Medians zwischen den Quantilen auch eine eventuelle Schiefe der Verteilung. Median- und Quantilwerte wurden durch ein Rechnerprogramm ermittelt, dem die Definition des Quantils p-ter Ordnung (24, S.101) zugrunde lag. Danach muß dieser Wert folgenden zwei Ungleichungen genügen:

$$P(X \leq xp) \geq p,$$
$$P(X \geq xp) \geq (1-p); \quad \text{für } (0<p<1).$$

X = Zufallsvariable (z.B. % intrazelluläres Hämoglobin)
xp = gesuchtes Element aus der Menge der Beobachtungen (=Quantil p-ter Ordnung)
P = Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen des in Klammern stehenden Ausdrucks
p = Wahrscheinlichkeit, die die Ordnung des Quantils festlegt

Genügen mehrere xp obiger Bedingung, so werden sie arithmetisch gemittelt. Der zugehörige Algorithmus ist den im Anhang mit abgedruckten Quellprogrammen "MEDIAN" bzw. "QUANT" zu entnehmen. Er läßt die Bearbeitung geringer Fallzahlen zu und bewirkt z.B. für N=2 die Auswahl des kleineren bzw. größeren Werts als entsprechendes Quantil und die Bildung des arithmetischen Mittels für den Median. Dies ist für die automatische Bearbeitung von Reihen mit unterschiedlicher Fallzahl der korrespondierenden Meßpunkte (siehe unten) von Bedeutung, wobei N gelegentlich sogar gleich 1 ist.

Die Berechnung der Medianwerte korrespondierender Punkte erfolgte zunächst bei Mehrfachmessung eines Individuums. Soweit die Meßreihen vergleichbar waren, wurden dann mit den einander entsprechenden Medianwerten verschiedener Individuen unter gleicher Wichtung erneut Median und Interquantilsbereich errechnet.

Die Vergleichbarkeit der Messungen an verschiedenen Individuen wurde im Rahmen der Auswertung auch dann als gegeben angesehen, wenn sich die Intensitätsfolgen des jeweiligen schädigenden Agens nicht genau überlappten (z.B. wenn die Verdünnungsreihen des Pharmakons sich in einzelnen Werten unterschieden). Dies hat bei den gemittelten korrespondierenden Meßpunkten unterschiedliche Fallzahlen zur Folge, welche aus den Tabellen zu den graphischen Darstellungen (im Anhang) im einzelnen zu entnehmen sind.

Unter "Individuum" wird hier die Zellsuspension verstanden, die für den betreffenden Versuchstag eigens aus gewaschenen Erythrozyten hergestellt wurde. Dabei ist nicht auszuschließen, daß eine Person mehrmals als Frischblutspender diente. Analoges gilt für die ACD-Konserven, aus denen mehrmals Proben entnommen wurden. Trotz identischen Spenders wurden unterschiedliche Individuen angenommen, da die Ansätze (behandlungsfertige Suspension, Wirkstoffverdünnungen usw.) jedesmal neu bereitet wurden und die Zellpopulationen an den verschiedenen Versuchstagen unterschiedlich alt waren.

In den Abbildungen wird unterhalb bzw. oberhalb des Medianwertes das 25. bzw. das 75. Perzentil markiert, wenn Mittelungen verschiedener Individuen vorgestellt werden.

Berechnung der Prozentdifferenz gegen unbehandelte Zellen

Die Mittelung der Beobachtungsgrößen "Prozent intrazelluläres Hämoglobin" bzw. "Prozent Erythrozyten auf Filter" selbst ist bei den Dosis-Wirkungs-Kurven nicht sinnvoll. Aufgrund der interindividuellen Streuung oder von Fehlern bei den am gleichen Individuum wiederholten Meßreihen liegen solche Kurven unterschiedlich hoch. Um bei der Mittelung der Wiederholungsmessungen am gleichen Individuum und der verschiedenen Individuen möglichst nur den Effekt des Pharmakons zu erhalten, wurde für jeden Meßwert mit Wirkstoff die Prozentverschiebung gegen die Kontrolle ohne Wirkstoff berechnet. Für jede Pharmakon-Verdünnungsreihe existiert mindestens eine solche Kontrolle. Im Fall mehrerer Kontrollen innerhalb einer Meßreihe wurde das arithmetische Mittel herangezogen. Bei der Desorptionsmethode erfolgte für jede einzelne Wirkstoffverdünnung eine eigene Kontrollmessung ohne Wirkstoff (siehe dort).

Nach der Gleichung

$$D = P - K$$

D = Prozentverschiebung
P = Prozent intrazelluläres Hämoglobin unter Pharmakoneinfluß
K = Prozent intrazelluläres Hämoglobin ohne Pharmakon

bewirkt ein stabilisierender Effekt ein Abweichen in positiver, ein destabilisierender in negativer Richtung. Die so erhaltenen Prozentdifferenzen wurden schließlich zur Ermittlung der Lageparameter (Median und Quantil) weiter verwendet.

Zwei Prinzipien der Dosis-Wirkungs-Messung

Bei den Ultraschallversuchen wie bei den Messungen mit Druckdifferenz am Filter wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung nach zwei verschiedenen Prinzipien erhalten: Entweder wurde Beschallungszeit bzw. Druck variiert und für jede Wirkstoffkonzentration eine angepaßte Kurve erhalten, oder es wurde nach Ermittlung der halbmaximal schädigenden physikalischen Größe diese konstant gehalten und nur die Konzentration der untersuchten Wirksubstanz variiert. Näheres siehe bei der Beschreibung des Versuchsaufbaus der jeweiligen Methodik.

Verarbeitung der Funktionen zu Dosis-Wirkungs-Kurven

Um aus den vom Rechnerprogramm angepaßten Funktionen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu gewinnen, mußte eine Umrechnung erfolgen: Aus der angepaßten e-Funktion, die durch Messung ohne Pharmakonzusatz (Kontrolle) erhalten wurde, läßt sich ein Halbwert ermitteln (siehe oben). Anwendung dieser Beschallungszeit bzw. dieser Druckdifferenz schädigt unbehandelte Erythrozyten halbmaximal. Setzt man diesen Halbwert als x-Wert in die gesamte Schar der angepaßten Funktionen, die mit Pharmakonzusatz erhalten wurden, ein, so ergeben sich Prozente intrazellulär verbliebenen Hämoglobins, die den einzelnen Wirkstoffkonzentrationen zuzuordnen sind. Hat der untersuchte Wirkstoff keinen Einfluß auf die mechanische Fragilität der Erythrozyten unter Beschallung bzw. Scherkräften, verbleiben 50% des Hämoglobins intrazellulär. Bei stabilisierenden bzw. destabilisierenden Effekten sind es entsprechend mehr bzw. weniger.

Wenn der Kontroll-Halbwert ohne Pharmakon wiederholt bestimmt wurde, so daß für die Kontrolle mehrere einfache e-Funktionen angepaßt werden konnten, erfolgte Bildung des arithmetischen Mittels der angepaßten Parameter (a; Koeffizient im Exponenten) und Umrechnung in den Halbwert gemäß $x_{1/2}=-\ln(2)/a$.

Ausschaltung der Vorhämolyse

Einsetzen des obigen Kontroll-Halbwerts in die angepaßte "Kontrollfunktion" selbst kann nicht genau 50% ergeben, da die angepaßte Funktion an der Stelle 0 (sec bzw. mm Hg) normalerweise unter 100% intrazellulärem Hämoglobin lag. In der angepaßten einfachen e-Funktion bezeichnet der Koeffizient Ao (bzw. die Summe Ao+Bo bei der doppelten e-Funktion) den Prozentsatz des zu Beginn der mechanischen Belastung eingebrachten intrazellulären Hämoglobins im Vergleich zu dem ursprünglich in der frisch bereiteten Erythrozytensuspension befindlichen. Allein während der Bereitung des beschallungs- bzw. filterfertigen Ansatzes hat eine geringe Hämolyse bis zu etwa 5%-7% stattgefunden. Hinzu kommt noch ein eventueller hämolysierender Effekt aufgrund erniedrigter Osmolarität oder durch das Pharmakon selbst, so daß der "Startwert" Ao (bzw. Ao+Bo) bei den verschiedenen Kurven mehr oder weniger unter 100% liegt. Die Differenz zu 100% ergibt das Ausmaß der Vorhämolyse (siehe Kurvenanpassung).

Diese nicht durch die gezielte physikalische Behandlung verursachte Schädigung läßt sich rechnerisch eliminieren, indem man in der angepaßten einfachen e-Funktion den Koeffizienten Ao gleich 100 setzt. Damit wird ein neuer 100%-Punkt definiert, der dem zur Beschallung bzw. zur Filterbehandlung gebrachten intrazellulären Hämoglobin entspricht. Einsetzen des Halbwerts

der Kontrolle in deren angepaßte und auf diese Weise normalisierte e-Funktion selbst ergibt dann zwangsläufig genau 50%. Der Halbwert der Kontrolle entspricht als Maß für die Empfindlichkeit unbehandelter Zellen der halbmaximalen Vorschädigung bei den direkt (d.h. mit fixer Beschallungszeit bzw. Druckdifferenz) gemessenen Dosis-Wirkungs-Kurven.

Einsetzen dieses Kontroll-Halbwerts in die zur jeweiligen Wirkstoffkonzentration gehörige normalisierte Funktion und Berechnung der Prozentverschiebung gegen den Kontrollwert intrazellulären Hämoglobins (50%) justiert den maximalen "Zeigerausschlag" für den Pharmakoneffekt auf ±50%, wobei Abweichung nach positiven Werten Stabilisierung bedeutet, nach negativen Destabilisierung (siehe oben). Eine etwaige pharmakoninduzierte oder sonstwie durch Vorbehandlung verursachte "Spontanhämolyse" tritt demgemäß nicht mehr in Erscheinung. Bei der Methode mit konstant gehaltenem halbmaximal schädigenden Wert ist eine solche Rechenkorrektur nicht möglich. Der "Zeigerausschlag" ist nicht auf ±50% begrenzt und die Vorhämolyse ist anderweitig zu berücksichtigen (z.B. durch Parallelmessung ohne Filterbehandlung, siehe spezielle Methodik).

Mittelung der verschiedenen Dosis-Wirkungs-Kurven

Als Mittelung bei Mehrfachmessung eines Individuums wie auch für die Daten verschiedener Individuen wurde der Medianwert der korrespondierenden Meßpunkte gewählt. Dabei erfolgte die Mittelung wiederholter Beobachtung desselben Individuums vorrangig, so daß ein jedes mit gleicher Wichtung in die Gesamtaussage eingeht. Bei Mittelung verschiedener Individuen wurde zusätzlich als Streuungsmaß der Bereich zwischen den Quantilen $p = 0.25$ und $p = 0.75$ angegeben. In diesem Interquantilsbereich liegen 50% der Beobachtungen.

Nach dem bisher Gesagten verbietet sich die Mittelung von Dosis-Wirkungs-Werten, wenn sie aus verschiedenen Methoden (direkt oder über e-Funktionen) erhalten wurden. Während die ersteren das Gesamthämoglobin der ursprünglich bereiteten Erythrozytensuspension als Standard besitzen, wird bei den anderen der 100%-Wert durch rechnerisches Eliminieren der Vorhämolyse neu definiert. Es handelt sich somit um zwei verschiedene Prozent-Skalen. Die abgebildeten Dosis-Wirkungs-Kurven stammen also entweder von dem einen oder dem anderen Verfahren. Im folgenden wird vereinfacht von "direkter" bzw. "indirekter" Methode gesprochen.

Erhaltung einer statistischen Aussage

Die angegebenen Werte bei beiden Methoden stellen normalerweise Mediane von Prozentdifferenzen zur Kontrolle dar, die durch Beobachtung verschiedener Individuen gewonnen wurden. Zu jeder mittleren Differenz existiert als Streuungsmaß der 50%-Interquantilsbereich. Bei einigen Dosis-Wirkungs-Kurven wurde nur ein Individuum untersucht. In diesem Fall fehlt die Angabe des Interquantilsbereichs.

Da sich innerhalb dieser Streugrenzen definitionsgemäß 50% der Meßwerte bewegen, entspricht der halbe Interquantilsbereich dem 0.675-fachen der Standardabweichung: ±0.675*s schließt ebenfalls 50% der Beobachtungen ein (siehe statistische Tabellenwerke unter "z-Werte"). Division des halben Interquantilsbereichs durch 0.675 bringt daher auf einfache Weise einen Näherungswert für die Standardabweichung der Prozentdifferenz. Dieser Wert wurde zusammen mit der mittleren Prozentdifferenz für die Berechnung des Prüfmaßes t im Student'schen Test für verbundene Stichproben benutzt. Der Test wurde für jede Wirkstoffkonzentration (bzw. Osmolaritätsstufe) eigens im paarweisen Vergleich mit der Kontrolle durchgeführt, um eine Irrtumswahrscheinlichkeit (P-alpha: falsch positiv) für die Annahme eines statistischen Unterschieds zu ermitteln. Wenn nicht anders angegeben, gilt für die Entscheidung "signifikant oder nicht" das 5%-Niveau.

Signifikanztest mit angepaßten Funktionen

Wenn für einen bestimmten Zweck nur 1 Individuum getestet wurde, konnte der t-Test auf Unterschiede zwischen verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen bzw. Osmolaritätsstufen trotzdem dann ausgeführt werden, wenn wiederholt gemessen wurde. Die Aussage bleibt dann auf dieses Individuum beschränkt. Der wiederholten Messung vergleichbar ist es auch, wenn zur Kurvenanpassung geeignete Daten vorliegen. Dann konnte nämlich die Differenz der korrespondierenden Meßpunkte für den gepaarten t-Test herangezogen werden. Beispielsweise wurden auf diese Weise Versuchsreihen mit variabler Beschallungszeit verglichen, die mit unterschiedlich osmolarem Suspensionsmedium durchgeführt worden waren. Es konnten Aussagen über signifikante Unterschiede bezüglich der intrazellulär verbliebenen Hämoglobinfraktion gemacht werden (siehe Ergebnisse der Ultraschallmethode).

Da zur Ausschaltung der Vorhämolyse möglichst nur auf Unterschiede zwischen den Halbwerten getestet werden soll, müssen alle Meßpunkte durch den Koeffizienten Ao der angepaßten e-Funktion dividiert werden. Erneute Anpassung an diese normalisierten Punkte wird alle e-Funktionen für x=0 durch den gleichen Punkt y=1 gehen lassen (abgesehen vom Schätzfehler). Meßpunkte, die

aufgrund Vorhämolyse weniger intrazelluläres Hämoglobin anzeigen, würden ohne diese Normalisierung höhere Differenzen gegenüber der Kontrollreihe aufweisen und daher die Signifikanz fälschlich erhöhen. Bei Verwendung der so normalisierten Meßpunkte kommt aber nur eine durch Pharmakoneinfluß veränderte Empfindlichkeit gegenüber dem schädigenden Agens zum Tragen. Der Weg über die Normalisierung der Meßpunkte hatte auch den Vorteil, daß bereits vorhandene Rechnerprogramme für den gepaarten t-Test benutzt werden konnten.

Signifikanztest mit Regressionsgeraden

Die Untersuchungen mit verschiedenen Osmolaritätsstufen der Erythrozytensuspensionen im Rahmen der Scherkraftmethode (Druckgradient im Filterkanal) ergaben im Bereich von 200 bis 300 mosmol/l einen deutlichen linearen Zusammenhang zwischen angewandter Osmolarität und der resultierenden Prozentverschiebung intrazellulären Hämoglobins gegen die Werte in isotoner Suspension (siehe Ergebnisse).

Besonderes Interesse galt hierbei der Frage nach Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber osmotischen Veränderungen unter dem zusätzlichen Einfluß verschiedener Bedingungen wie z.B. Aufbewahrungsdauer der Zellen. Als Parameter für die osmotische Empfindlichkeit der Erythrozyten wurde die Steilheit der Regressionsgeraden herangezogen, die an die Meßpunkte (Prozentverschiebung gegen mosmol/l) angepaßt wurde. Zur Prüfung auf Signifikanz der Regressionskoeffizienten gegeneinander diente auch hier der Student'sche t-Test. Die Berechnung des Prüfmaßes t geschah nach der Formel für den Vergleich zweier Regressionskoeffizienten (vgl. hierzu 56, S.341).

Benutzte Rechner und Programme

Für die Auswertung der Meßergebnisse stand ein Olivetti-Computer, Modell P6060 mit 24 kbyte Anwenderspeicher zur Verfügung. Die Basic-Programme wurden selbst erstellt und umfassen Aufbereitung der Originaldaten (Extinktion), Verwaltung der Versuchsdateien, statistische Analysen (Kurvenanpassung an einfache und doppelte e-Funktionen und Polynome, Mittelung von Versuchsreihen, Signifikanztests; siehe oben) und Darstellung der Ergebnisse (Tabellen, hochauflösende Punktgraphik).

Die mit Olivetti-P6060 erreichbare Qualität der Punktgraphik erschien für die Publikation allerdings nicht ausreichend. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten graphischen Darstellungen wurden daher mit Hilfe eines XY-Plotters der Fa. Watanabe, Modell WX 4671, ausgeführt. Zur Steuerung des Plotters

wurden Basic-Programme für einen Commodore-Rechner, Modell 3032 mit 32 kbyte Anwenderspeicher, erstellt. Sie veranlassen das Zeichnen und Beschriften von Abszisse und Ordinate sowie das Eintragen von Meßpunkten mit selbstgewählten Symbolen (neben dem ASCII-Zeichensatz stehen noch 16 weitere Symbole zur Verfügung). Die Meßpunkte können durch Geraden automatisch verbunden werden. Weiterhin kann eine Funktion (y=f(x), z.B. eine an die Meßdaten angepaßte Kurve) eingezeichnet werden. Abszissen- bzw. ordinatenparallele Markierungslinien (gestrichelt) sind ebenfalls möglich. Für Abszisse und Ordinate kann linearer oder logarithmischer Maßstab gewählt werden. Eintragen eines "Nullwerts" (z.B. Kontrolle mit Wirkstoffkonzentration = 0) außerhalb der logarithmischen Achse ist möglich.

Das Zeichnen von Schrifttypen und Sonderzeichen wird ebenfalls vom Basic-Programm übernommen, da die im Prozessor des Plotters implementierten Zeichen teilweise unübersichtlich sind und nur 16 Zeichengrößen sowie 4 Schreibrichtungen gewählt werden können. Die hier entwickelte programmgesteuerte Zeichenausgabe erleichtert das Beschriften von graphischen Darstellungen durch den Plotter. Die Plotter-Programme sind in drei Aufgabenbereiche unterteilt: Zeichnen von Diagrammen, Beschriften mit Texten und Erstellen beliebiger eigener Schriftzeichen und Symbole durch den Anwender.

Die im folgenden stichpunktartig beschriebenen Basic-Quellprogramme für Olivetti P6060 sind im Anhang in der gleichen Reihenfolge abgedruckt. Daran anschließend finden sich die Graphik-Programme für Commodore/Watanabe.

INPUT, INPUT1, INPUT2: Eingabe der Originaldaten (z.B. Extinktion und zugehörige Druckdifferenz) mit Standards, letztere wahlweise für jede Extinktion eigens oder Mittelwertbildung für einen gemeinsamen Standard/Meßreihe; Berechnung % intrazelluläres Hb unter Berücksichtigung eines Küvettenfehlers und eines Volumenkorrekturfaktors; Abspeicherung von Daten und erklärenden Textzusätzen in Sequentialfiles, Formatierung der Files (4 Zeilen, n Spalten) für alle anderen hier aufgeführten Programme (Ausn.: FMIX und FPRTAB) gültig; Korrekturmöglichkeiten für eingegebene oder bereits abgespeicherte Daten; Tabellenausdruck.

CMD, CMD1: Abfrage der gewünschten Kurvenanpassung (einfache/doppelte e-Funktion, Polynom bis max. 9.Grades) und der Parameter für die graphische Darstellung (z.B. lineare/logarithmische Achse, Formate, Wertebereiche, Bildlegenden usw.); auch Eintragen der Meßwerte ohne angepaßte Funktion oder Punktverbindung durch Geraden möglich; Darstellen der Werte mit frei wählbaren Symbolen oder als Säulendiagramm; Steuerung der nachfolgenden 9 Auswertungs- und Graphikprogramme (FITEFN bis PRIDIS); Auftragsvergabe möglich für mehrere Bilder mit jeweils mehreren Meßreihen (o.a. Auswertungsmöglichkeiten frei kombinierbar), anschließende selbständige Abarbeitung durch die Programme.

FITEFN: Anpassung an einfache e-Funktion, s. Methodik (Kurvenanpassung).

FITPOL: Anpassung an Polynom.

PEEL2, FITEF2: Anpassung an doppelte e-Funktion, s. Methodik (Kurvenanpassung).

PLOT0, KMARK, XYPLOT: Graphik-Programme: Vorbereitung der Koordinatenachsen, Markierung der angepaßten Funktionen, Graphik-Ausführung.

PLTAB: Bildlegenden, evtl. mit angepaßten Parametern, auf Wunsch mit Wertetabellen.

PRIDIS: Optische und akustische Meldung, daß alle Aufträge ausgeführt sind, mit der Möglichkeit, Nachrichten an nachfolgende Benutzer zu hinterlassen.

RESID: Residuals Meßdaten gegen angepaßte Funktion (gemessen - berechnet), Abspeichern in Sequentialfile.

FNYXI: Umwandlung einer Kurvenschar angepaßter Funktionen (mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen erhalten), in Dosis-Wirkungs-Beziehung (Berechnung der Funktionswerte an (mehreren) beliebigen Stellen, Abspeichern in Sequentialfiles.

DPROZ: Berechnung der %-Differenzen zur Kontrolle (Meßwert mit Pharmakon - Meßwert ohne, benutzt für Ultraschall- und Scherkraft-Daten); Lesen der Originaldaten aus Sequentialfiles, automatisches Aufsuchen der "Wirkstoffkonzentrationen Null", daraus evtl. Mittelwertbildung, Abspeichern der %-Differenzen in Sequentialfiles.

FDIFF: Differenz korrespondierender y-Werte (mit gleichem x) aus 2 Datenfiles (benutzt für Daten der Desorptionsmethode), Abspeichern.

FUSION: Zusammenfassen zweier Datenfiles, x-Werte werden steigend sortiert; dient zur Vorbereitung für Programme MEDIAN und QUANT.

MEDIAN: Medianwerte der korrespondierenden y-Werte (mit gleichem x) aus fusionierten Datenfiles, auf Wunsch nach Klassenbildung; Abspeichern der Ergebnisse mit zugehörigem x-Wert, Fallzahl und Interquantil 50.

QUANT: Wie Median; Abspeichern von Quantil 25 und Quantil 75 anstelle von Interquantil 50 und Medianwert (eigenes File nötig wegen vorgegebener Formatierung).

AMSD: Arithmetische Mittelwerte, analog wie MEDIAN; Abspeichern von $\bar{y}$ und Standardabweichung anstelle von Medianwert und Interquantil 50.

TTVHW: Verbundener t-Test korrespondierender y-Werte (mit gleichem x) aus 2 Datenfiles, nach Wunsch mit Normalisierung (Division durch Koeffizienten der angepaßten e-Funktion); Ausdruck t und Freiheitsgrade.

TTUREG: Test zweier Regressionskoeffizienten gegeneinander; Ausdruck t und Freiheitsgrade.

PTFG: Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit P-alpha (für falsch positive Annahme eines Unterschieds) aus t und Freiheitsgraden bei zweiseitiger Fragestellung.

FMIX: Zusammenstellung eines Datenfiles mit Formatierung der Daten in m Zeichen und n Spalten, Zeilenanzahl also nicht mehr auf 4 fixiert wie bei bisheriger Formatierung; Dateneingabe manuell oder beliebige Zeilen aus anderen Datenfiles (mit n Spalten) in beliebiger Reihenfolge; dient der übersichtlicheren Zusammenstellung von Tabellen aus Originaldaten bzw. Auswertungsergebnissen.

FPRTAB: Ausdruck von Tabellen mit m Zeichen und n Spalten; bei n>10 Ausgabe in Zehnergruppen, da max. 10 Werte/Zeile; pro Wert max. 5 Textspalten; Gleitkommadarstellung mit 3 Stellen (1 für Vorzeichen, evtl. 1 für Dezimalpunkt); Exponentialdarstellung mit 2 Stellen für Mantisse, 1 für Vorzeichen des Exponenten, 1 für Exponent (Format: $n_1.n_2 \pm e$); auf Exponentialdarstellung negativer Zahlen wurde zugunsten räumlicher Sparsamkeit verzichtet, da beim vorliegenden Datenmaterial keine Notwendigkeit dazu bestand.

PLIST: Formatiertes Listen von P6060-Basic-Programmen mit Sprungzielmarkierung; Zeilen/Seite und Spalten/Seite wählbar, linker und rechter Rand einstellbar; automatische Seitenformatierung; bei Basic-Zeilen, die Sprungziel sind, Angabe der Zeilennummer, die Sprunganweisung enthält.

PLOTTER, PLOT-DIAGRAM, PLOT-TEXT: Graphik-Programme für Commodore-Rechner 3032/8032 und Watanabe-Plotter: Erstellen beliebiger Symbole und Schriftzeichen, Zeichnen von Diagrammen, Beschriften mit Texten; nähere Beschreibung siehe oben.

DISKUSSION DER METHODIK

Ausschaltung der Vorhämolyse

Aus einer Schar angepaßter einfacher e-Funktionen (eine Kurve pro Konzentration) wurde wie beschrieben der Prozentsatz intrazellulären Hämoglobins berechnet und der Einfluß diverser Pharmaka auf diese Größe ermittelt. Eine solche Messung kann einfacher auch direkt durch geeignete Wahl der Beschallungszeiten bzw. Druckgradienten durchgeführt werden. Allerdings wird die 50-prozentige Vorschädigung auf diesem Weg nicht zuverlässig genug erreicht, so daß die Vergleichbarkeit der Messungen untereinander dadurch leiden kann. Weiterhin läßt sich die pharmakoninduzierte oder sonstwie verursachte Hämolyse nicht durch einfache Rechnung korrigieren.

Andererseits kann das rechnerische Eliminieren der nicht durch die physikalische Behandlung (Ultraschall bzw. Scherkraft) verursachten Hämolyse dazu führen, daß aus der ursprünglich vorhandenen Population gewaschener Erythrozyten nur eine etwas robustere "Elite" in der Auswertung berücksichtigt wird.

Sieht man nun einen stabilisierenden Einfluß des Pharmakons gegenüber der Kontrolle, so mag dieser zum Teil auch dadurch entstanden sein, daß ein hämolysierender Pharmakoneffekt rechnerisch beseitigt wurde, wo sich sonst zwei gegensinnige Effekte überlagert hätten. Ebenso könnten die nach Pharmakonhämolyse verbleibenden Erythrozyten auch gegen den physikalischen Stress unempfindlicher sein und so eine Stabilisierung der Gesamtpopulation vortäuschen.

Kritisch muß die rechnerische Ausschaltung der Vorhämolyse allerdings dann gewürdigt werden, wenn durch Vorbehandlung bereits ein großer Anteil der Erythrozyten zerstört wurde und damit die Zahl der untersuchten Zellen gegenüber dem Gesamthämoglobin klein ist. Die Korrektur eines geringen Restes intrazellulären Hämoglobins auf 100% multipliziert auch den Meßfehler, so daß "Ausreißer" zu erwarten sind. Als Beispiel kann die Ultraschall-Messung mit höheren Konzentrationen von Na-dodecylsulfat genannt werden, siehe Ergebnisteil.

Mittelung der Halbwerte

Da oft pro Individuum mehrere Kontrollen ohne Wirkstoff gemessen wurden, mußte ein geeigneter Weg zur Mittelung der Halbwerte gefunden werden. Dabei kommt die arithmetische Mittelung des angepaßten Parameters im Exponenten (a) mit anschließender Rückrechnung auf den Halbwert der besten Lösung näher als die Mittelung der Halbwerte selbst. Dies wird ersichtlich, wenn man den gemittelten Halbwert des Kontrollblutes in die angepaßten Kontrollblut-Funktionen selbst wieder einsetzt und so Werte um 50% intakte Zellen erhält, deren Mittelwert wiederum nicht, wie eigentlich zu fordern wäre, genau 50% beträgt.

Bei den üblicherweise innerhalb eines Individuums nicht stark streuenden Kontrollwerten wurde der mit diesem Mittelungsverfahren verursachte Fehler von im allgemeinen unter 1% vernachlässigt. Der umständlichere Weg, die Rechnung mit jedem Kontroll-Halbwert zu wiederholen (um dadurch im Einzelfall genaue 50% zu erhalten), und die korrespondierenden Werte für die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen zu mitteln, wäre zwar exakt gewesen, konnte aber so vermieden werden.

Gleiche Wichtung der direkten und der indirekten Methode

Da für jedes Individuum mehrere angepaßte Kurven bei unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen erhalten wurden, läßt sich auch bei der indirekten Methode nach erfolgter Umrechnung die angewandte Konzentration gegen den Effekt in Form der Prozente intrazellulären Hämoglobins graphisch auftragen und so eine mit der direkten Methode vergleichbare Darstellung erreichen.

Bei den nach der direkten Methode gewonnenen Dosis-Wirkungs-Kurven fanden für ein Individuum mehrere Messungen unter identischen Bedingungen statt. Aus den korrespondierenden Meßpunkten konnte der Medianwert berechnet werden. Der Weg über die angepaßten e-Funktionen dagegen ergab pro Individuum entsprechend den unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen mehrere Kurven mit ihren Kennparametern, aus denen sich wiederum eine einzelne Dosis-Wirkungs-Kurve errechnen ließ. Da aber auch beim "indirekten" Vorgehen jeder Kurvenpunkt (Wirkstoffkonzentration, Prozent) aus mehreren Stützpunkten (Druck, Prozent) durch Kurvenanpassung gemittelt worden war, sind die aus beiden Methoden gewonnenen Kurven als Mittelwert eines Individuums anzusehen und können beim Vergleich der Individuen ohne groben Fehler gleich gewichtet werden.

VERSUCHSAUFBAU DER ULTRASCHALLMETHODE

Mit Ultraschall behandelt wurden Erythrozytensuspensionen von einem Hämatokrit zwischen 0.3% und 5%. Beobachtungsgröße war die Freisetzung von Hämoglobin in Abhängigkeit von der Zeit. Dabei wurde geprüft, ob sich die Empfindlichkeit der Zellpopulation unter Einfluß von Chlorpromazin, Na-dodecylsulfat, trifunktionalem Stickstofflost (HN3) sowie in Medien mit erhöhter oder erniedrigter Osmolarität ändert. Als isotones Suspensionsmedium diente Parpat's oder "Phosphate Buffered Saline" (PBS).

Versuchsanordnung

Für die Erzeugung des Ultraschalls standen Geräte der Fa. Measuring & Scientific Equipment Ltd. (MSE), 25-28 Buckingham Gate, London S.W.1, zur Verfügung. Die genaue Modellbeschreibung und Arbeitsanleitung findet sich in "MSE Technical Publication No.70". Von den Anweisungen der Bedienungsanleitung wurde nicht abgewichen.

Der Schall hatte eine Frequenz von 20 kHz und wurde auf die Suspension mit Hilfe eines vertikal schwingenden Metallstabes übertragen, der an seiner Unterseite plan geschliffen war. Zum Gerät wurden 2 zylindrische Stäbe mit 9.5 und 19 mm Durchmesser und ein exponentiell sich verjüngender Stab mit 3 mm Enddurchmesser mitgeliefert. Alle Stäbe bestanden aus Titan. Der kleinere zylindrische Stab erbringt eine größere Schallamplitude in der Probenflüssigkeit, also mehr übertragene Schallenergie. Diese ist jedoch auf einen kleineren Bereich konzentriert. Der "exponentielle" Stab dient zur Beschallung kleinerer Probenmengen bis 5 ml. Zur Beschreibung des Zubehörs siehe "MSE Publication No.502". Außerdem wurden noch Stäbe benutzt, welche die Hauswerkstatt aus Stahl angefertigt hatte. Diese Stäbe unterschieden sich nur durch den Flächenquerschnitt an der Unterseite voneinander.

Als Parameter für die mit einem bestimmten Stab übertragene Schallenergie ließ sich dessen vertikale Auslenkung in μm (Peak to Peak) am Gerät ablesen. Der Ablesefehler muß mit etwa 0.2μ eingeschätzt werden. Die Einstellung der Amplitude erfolgte in Pufferlösung oder Wasser. Zur Beschallung befanden sich die Proben in Bechergläsern (25 ml) mit ca. 15 ml Inhalt, zumeist aber in Eppendorf-Cups mit 1 ml Inhalt.

Im Rahmen der Vorversuche (deren Ergebnisse nicht weiter angeführt werden) erwies es sich hinsichtlich Größe und Reproduzierbarkeit der Effekte als günstig, nur den exponentiell dünner werdenden Titanstab mit 3 mm Enddurchmesser zu benutzen und die Beschallung in Eppendorf-Cups (1 ml) vorzunehmen. Für die nachfolgend beschriebenen Versuchsergebnisse wurde dies beibehalten.

Zum Teil wurden die Beschallungszeiten mittels Stoppuhr und manueller Betätigung des EIN/AUS-Schalters eingestellt, was aber nur für Zeiten ab etwa 5 Sekunden mit genügend geringem relativen Fehler möglich war. Für die späteren Versuche wurde daher eine Schaltuhr aus dem Photolabor in den Stromkreis des EIN/AUS-Schalters zwischengeschaltet, was die Einhaltung kürzerer Zeiten (bis ca. 0.2 sec) ermöglichte.

Ausführung

Entweder wurden zunächst Proben mit einem Hämatokrit von 5% beschallt und daraus 66 µl zu 1 ml 0.9-prozentiger NaCl pipettiert, um dies zu zentrifugieren und freigesetztes Hämoglobin photometrisch zu bestimmen, oder es erfolgte gleich die Herstellung eines entsprechend niedrigen Hämatokrits (0.3% bis 0.4%), um mit dieser Suspension entsprechend zu verfahren.

Normalerweise wurden die Versuche mit steigenden Beschallungszeiten vorgenommen. "0 sec" bedeutet unbeschallte Kontrollprobe. Beobachtet wurde jeweils die Hämoglobinfreisetzung im Verlauf länger werdender Beschallungsdauer. Nach einer Kontrollreihe ohne Pharmakon folgte Wiederholung für verschiedene Konzentrationen.

Bei 2 Versuchen (mit Na-dodecylsulfat) wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung direkt gemessen, indem nach einer Kontrollreihe die Halbwertszeit bestimmt (siehe "Kurvenanpassung") und Proben mit verschiedener Wirkstoffkonzentration nur für diese konstante Zeit beschallt wurden.

Standards

Die 100%-Standards wurden nach folgendem Vorgehen erhalten:

1) Einfrieren bei -22°C im Tiefkühlraum für mindestens eine Stunde und anschließendes Auftauen.

2) 100 µl Probe in 0.9 ml Wasser pipettieren. Abgelesener Extinktionswert multipliziert mit 10.

3) Beschallung genügender Dauer und Intensität, um alle Zellen zu hämolysieren: 60 - 120 sec, teilweise 30 min, bei einer Amplitude von 4 - 6 µm.

4) 0.066 ml Suspension Hämatokrit 5 in 1 ml Wasser (wenn bei den Proben gleich verfahren wurde).

Pro Versuch fanden Mehrfachbestimmungen des Standards nach verschiedenen Methoden statt, um daraus das arithmetische Mittel zu bilden.

Viskositätsmessung

Um die Viskosität von Erythrozytensuspensionen zu bestimmen, die mit 10% bzw. 20% Hydroxyäthylstärke versetzt waren, wurde für das Haake-Viscometer eine Eichkurve mit Aceton, Aqua demin., konzentrierter Essigsäure, Anilin und Äthylenglykol bei 40°C erstellt. Während der Ultra-Beschallung wurde Erwärmung auf etwa diese Temperatur festgestellt. Für jede Substanz wurden dreimal die Skalenteile abgelesen, gemittelt und gegen die bekannten Viskositätswerte aufgetragen. Die Angaben zur Viskosität der genannten Substanzen wurden dem CRC-Handbook of Chemistry and Physics (75) entnommen. Die Eichkurve ist in Abb.1 aufgetragen. Ein Skalenteil des Haake-Viscometers entspricht 0.21 ±0.028 cP (Mittelwert ± Standardabweichung).

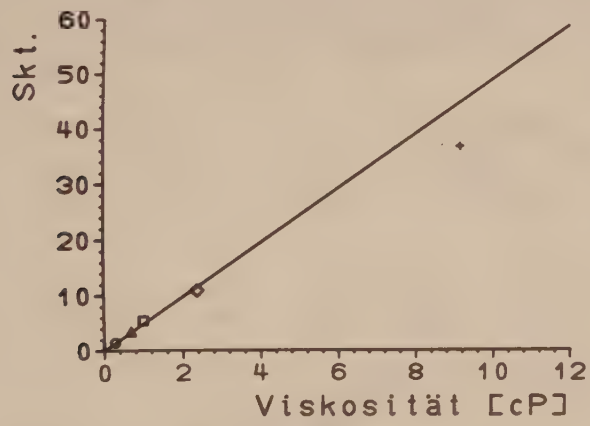


Abb.1

Eichkurve für das **Haake-Viscometer** mit Aceton, Aqua demin., konzentrierter Essigsäure, Anilin und Äthylenglykol bei 40°C. Für jede Substanz wurden dreimal die Skalenteile abgelesen, gemittelt und gegen die bekannten Viskositätswerte aufgetragen. Ein Skalenteil des Haake-Viscometers entspricht 0.21 ± 0.028 cP (Mittelwert ± Standardabweichung).

"○" = Aceton "△" = Aqua demin. "□" = konz. Essigsäure
"◇" = Anilin "+" = Äthylenglykol

ERGEBNISSE DER ULTRASCHALLMETHODE

Normalbedingungen: Wie verläuft die Hämoglobinfreisetzung **ohne Wirkstoffzusatz** unter Anwendung **variabler Beschallungszeit**?

Die Hämoglobinfreisetzung aus Erythrozyten zeigt einfachen exponentiellen Verlauf in Abhängigkeit von der Beschallungszeit, wobei eine halbmaximal schädigende Beschallungsdauer (Halbwertszeit) angegeben und als Vergleichsmaß für die Empfindlichkeit der untersuchten Zellpopulationen benutzt werden kann. Mit dem beschriebenen Versuchsaufbau und einer Amplitude von 2 μ "Peak to Peak" ergab sich eine Halbwertszeit von 7.2 sec (vgl. Abb.2). Sie wurde mit 30 Erythrozytensuspensionen ohne Wirkstoffzusatz in isotonem Medium ermittelt.

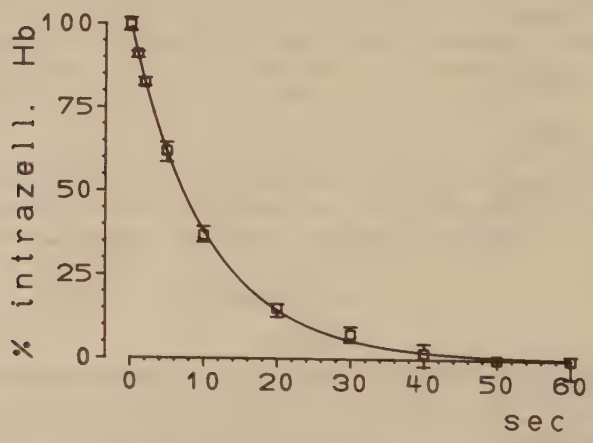


Abb.2

Prozent intrazellulär verbliebenes Hämoglobin in Abhängigkeit von der **Expositionszeit mit Ultraschall.** Untersucht wurden 30 Erythrozytenpopulationen von gesunden Spendern bzw. von ACD-Konserven. Horizontale Markierungen begrenzen den 50%-Interquantilsbereich. An die Meßdaten wurde eine einfache e-Funktion der Form $Y = Ao * e^{-a*x}$ angepaßt.

Parameter:	$Ao = 100$	$a = 0.0965$
Standardabw.:	$S_{Ao} = 1.09$	$S_a = 0.003025$
Halbwertszeit:	$t_{1/2} = 7.183$ sec (95%-Konfidenzintervall: 6.767 bis 7.650)	

Die Abb.2 zeigt hierzu den entsprechenden Kurvenverlauf. Es wurde eine einfache e-Funktion an die mit dem Medianwertprogramm gemittelten korrespondierenden Meßpunkte (Beschallungszeit, % Hämoglobin) dieser 30 Kontrollsuspensionen angepaßt. Davon wurden 27 Ansätze unter Verwendung von Blut aus ACD-Konserven hergestellt, deren Aufbewahrungsdauer innerhalb der angegebenen Verfallsgrenzen lag. Für die übrigen 3 Ansätze wurde wiederholt Venenblut eines Spenders verarbeitet. Zwischen den Halbwertszeiten aller Kontroll-Ansätze bestand kein auffälliger Unterschied.

Bei allen Ultraschall-Versuchen mit variabler Beschallungszeit erbrachte die Anpassung an eine doppelte e-Funktion (im Vergleich zur einfachen) keine geringere Restvarianz, also keine höhere Güte der Anpassung. Von insgesamt 143 Meßreihen mit variabler Beschallungszeit waren bei nur 5 Anpassungen alle zwei Kompartimente (d.h. alle 4 Parameter) statistisch signifikant gegen 0; bei weiteren zwei waren ein Kompartiment und eine zusätzliche abszissenparallele Komponente (d.h. der Koeffizient Ao bzw. Bo) signifikant (zur Signifikanz der Kompartimente siehe näheres unter "Streuung"). Betrachtet man es nun als falsch positive Aussage, wenn zusätzlich zu den beiden Parametern e i n e s Kompartiments wenigstens noch die Abszissenparallele des anderen signifikant wird, so liegen diese 7 falsch positiven Aussagen entsprechend dem hier geforderten Signifikanzniveau von 5% im Bereich des erwarteten alpha-Fehlers.

Von den 5 Beschallungsreihen mit "signifikantem" Zwei-Kompartiment-Modell waren allerdings in zwei Fällen die Kompartimente nicht gegeneinander signifikant, was noch zusätzlich gegen die Annahme des Zwei-Kompartiment-Modells bei den Ultraschall-Versuchen spricht. Dagegen liefert das Ein-Kompartiment-Modell befriedigende Anpassungen und in allen Fällen (mit und ohne Pharmakon) statistisch gegen 0 signifikante Parameter. Auch bei den in Abb.2 gezeigten Medianen der Kontrollen wird die Annahme eines 2-Kompartiment-Modells durch die Meßpunkte nicht bestätigt. Die Parameter der einfachen e-Funktion sind jedoch beide von 0 verschieden ($p \leq 0.05$).

Wie ändert sich die Ultraschallfragilität von Erythrozyten in Suspensionen **veränderter Osmolarität** im Vergleich zur isotonen Kontrolle?

Aus den im folgenden geschilderten Ergebnissen läßt sich auf eine höhere Ultraschallfragilität von osmotisch geschwollenen und eine Stabilisierung von osmotisch geschrumpften Erythrozyten schließen.

Die Versuche wurden mit einer etwa 2 1/2 Monate alten ACD-Konserve durchgeführt. Die Osmolarität ist in Gewichtsprozent der NaCl-Verdünnung angegeben. Für jede Osmolaritätsstufe kamen 5 verschiedene Beschallungszeiten zur Anwendung, um an die Meßdaten (% intrazellulär verbliebenes Hämoglobin) einfache e-Funktionen anzupassen und jeder Osmolarität eine Halbwertszeit zuzuordnen.

Tabelle der Halbwertszeiten

Die osmolaritätsabhängige Empfindlichkeit gegen Ultraschall ist mit der zur jeweiligen NaCl-Konzentration gehörigen Halbwertszeit tabellarisch dargestellt:

g% NaCl:	0.5	0.75	1.0	1.5	2.0	3.0
HWZ(sec):	0.75	0.87	0.87	1.2	2.2	2.8
$p \leq 0.05$:	s.	n.s.	---	s.	s.	s.

Zur Prüfung jeder NaCl-Verdünnungsstufe auf signifikant veränderte Ultraschall-Fragilität der darin suspendierten Erythrozyten wurden die Daten der Meßreihe mit 1g%-NaCl als Referenz genommen und der Student'sche Differenztest für verbundene Stichproben ausgeführt. Zur Korrektur des Einflusses einer etwaigen hypotonen Hämolyse wurden die Meßpunkte mit Hilfe der zugehörigen Koeffizienten Ao normalisiert (siehe Methodik unter: Signifikanztest mit angepaßten Funktionen). Der Test ergab für 0.75% NaCl keine Signifikanz (P-alpha = 85%), für alle übrigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit 2.9- bis 3.2-prozentiger Irrtumswahrscheinlichkeit.

Im Bereich von 0.75 g% bis 1 g% NaCl kann demnach für die untersuchte ACD-Konserve eine veränderte Ultraschallfragilität nicht angenommen werden. Verdünnung der NaCl-Konzentration auf 0.5% erhöht aber die Fragilität, Steigerung der Konzentration auf mindestens 1.5% vermindert dagegen die Fragilität der untersuchten Erythrozyten unter Ultraschallbehandlung.

Graphische Darstellung Prozent gegen Osmolarität

Abb.3 stellt die Abhängigkeit des intrazellulär verbliebenen Hämoglobins von der Osmolarität des Suspensionsmediums (dimensioniert in g% NaCl) bei definierter Beschallungszeit und -intensität (0.87 sec, Ampl.=4μ) graphisch dar. Aus den angepaßten einfachen e-Funktionen (Prozent als Funktion der Zeit) wurde durch Einsetzen von 0.87 sec (Halbwertszeit der Messung mit einprozentiger Natriumchlorid-Lösung) der Prozentanteil des Hämoglobins

errechnet, der unter dieser im isotonen Medium halbmaximal schädigenden Beschallungszeit intrazellulär verbleibt. Eine vor Beschallung möglicherweise bereits stattgefundene osmotische Hämolyse wurde berücksichtigt; das Auswertungsverfahren ist im gemeinsamen methodischen Teil beschrieben.

In Abb.3 ist die Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins zur Kontrolle gegen die eingestellte NaCl-Verdünnung aufgetragen. Die Figur zeigt eine deutliche hypertone Stabilisierung im Gegensatz zur relativ geringen Fragilitätserhöhung, die sich im Suspensionsmedium mit 0.5 g% NaCl einstellte. Unter dieser Osmolarität hat der Erythrozyt eine fast sphärische Form angenommen, denn mit 0.46 g% NaCl wurde bereits Hämolyse beobachtet. Die geringe Destabilisierung von ca. 5% ist also von relativ großer Volumenzunahme begleitet, die deutliche Stabilisierung von ca. 30% dagegen von vergleichsweise kleiner Volumenabnahme.

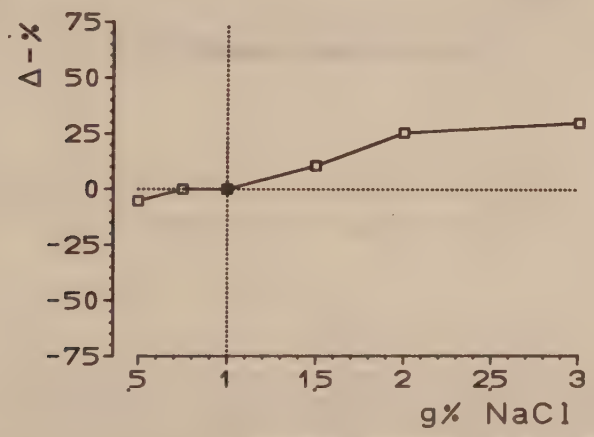


Abb.3

Einfluß der Osmolarität des Suspensionsmediums auf die Ultraschallfragilität von Erythrozyten. Die Stabilisierung im hypertonen Bereich ist deutlich größer als die Fragilitätserhöhung im hypotonen Medium. Die Prozentwerte wurden aus angepaßten einfachen e-Funktionen unter Berücksichtigung der osmotischen Hämolyse errechnet.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert mit 1 g% NaCl)
"■" = Kontrollwert

Ändert **Chlorpromazin** die Ultraschallfragilität von Erythrozyten im isotonen Medium?

Chlorpromazin (CPZ) ändert die Ultraschallfragilität von Erythrozyten in isotonem Suspensionsmedium nicht. Die Untersuchung der roten Blutkörperchen eines Frischblutspenders sowie aus zwei frischen und einer seit etwa 2 Monaten verfallenen ACD-Konserve ließ weder einen stabilisierenden noch einen destabilisierenden Effekt dieses Pharmakons erkennen.

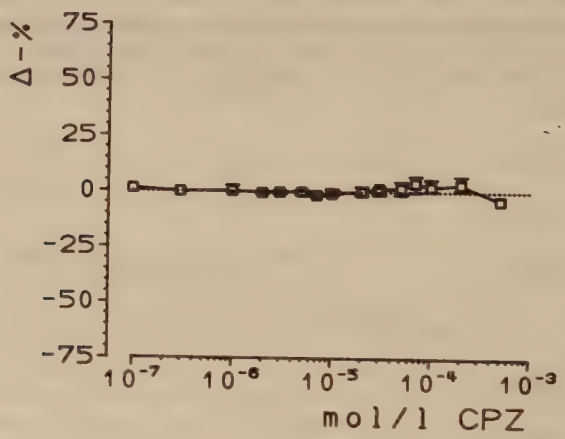


Abb.4

Einfluß von **Chlorpromazin** (CPZ) auf die Ultraschallfragilität von Erythrozyten. Auf dem 5%-Signifikanzniveau zeigt sich kein Unterschied zur Kontrolle. Die Prozentwerte wurden aus angepaßten einfachen e-Funktionen unter Berücksichtigung der pharmakoninduzierten Hämolyse errechnet. Untersucht wurden Erythrozyten eines Frischblutspenders, zweier frischer und einer überalterten ACD-Konserve.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert ohne CPZ)

Die Abb.4 zeigt die zugehörige Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die eingezeichneten Punkte bezeichnen die Mediane der korrespondierenden Beobachtungswerte der oben genannten 4 Individuen, ober- und unterhalb sind die entsprechenden 0.25- bzw. 0.75 Quantile markiert. Das Auswertungsverfahren nach Messung mit variabler Beschallungszeit umfaßt Kurvenanpassung, Berechnung der nach der Beschallungszeit $t_{1/2}$ (Werte siehe unten) intrazellulär verbliebenen Hämoglobinfraktion für jede CPZ-Konzentration unter Berücksichtigung der phar-

makoninduzierten Hämolyse; weiterhin Berechnung der wirkstoffbedingten Prozentverschiebungen gegen die Kontrolle für jedes Individuum sowie Bildung der Mediane und Quantile aus den so ermittelten korrespondierenden Werten der 4 Individuen. Das grundsätzliche Vorgehen ist im methodischen Teil nachzulesen.

Die halbmaximal schädigende Beschallungszeit $t_{1/2}$ betrug für die Kontrollen der vier Individuen 7.4, 7.5, 8.1, 1.1 sec. Die niedrige Halbwertszeit des letzten Ansatzes beruht darauf, daß bei diesem Versuch aus technischen Gründen eine andere Schalterstellung am Ultraschallgerät gewählt werden mußte, die eine erhöhte Schallamplitude von etwa 4μ "Peak to Peak" bedingte (sonst ca. 2μ). Wegen der Definition einer halbmaximal vorschädigenden Bedingung sind die Prozentdifferenzen zur jeweiligen Kontrolle dennoch mit den Ergebnissen bei den anderen Individuen vergleichbar. Der Student'sche Differenztest wurde für jede angewandte Konzentration eigens durchgeführt. Signifikante Unterschiede in der Ultraschall-Fragilität zwischen CPZ-inkubierten Erythrozyten und den Kontrollpopulationen ergaben sich auf dem 5%-Niveau nicht.

Ändert **Natrium-dodecylsulfat** die Ultraschallfragilität von Erythrozyten im isotonen Medium?

Die Versuchsergebnisse erbringen keinen Anhalt für einen Effekt von Na-dodecyl-sulfat (SDS) auf die Ultraschall-Fragilität von isoton suspendierten Erythrozyten. Es wurde sowohl die direkte Methode (mit fixer Beschallungszeit) als auch die indirekte (Berechnung des Dosis-Effekts aus angepaßten e-Funktionen) angewandt, die Meßergebnisse der ersteren finden sich in Abb.5. Nur das direkte Vorgehen erbrachte den Nachweis eines destabilisierenden Effektes bei höherer SDS-Konzentration, der hier aber nicht durch Erhöhung der Ultraschallfragilität, sondern durch pharmakoninduzierte Hämolyse verursacht wurde. Mit keiner der beiden Methoden konnte eine stabilisierende Wirkung von Na-dodecylsulfat nachgewiesen werden, jedenfalls nicht auf dem Signifikanzniveau von 5%.

a) direkte Methode

Bei zwei Ansätzen (Konservenblut) wurden die mit verschieden starken Wirkstoffkonzentrationen vorinkubierten Proben direkt 8 bzw. 10 sec mit Ultraschall behandelt. Das entspricht den unmittelbar zuvor ermittelten Halbwertszeiten der Kontrolle ohne Pharmakon. Aus den korrespondierenden Prozentdifferenzen zur Kontrolle wurden dann Mediane und Quantile berechnet (vgl. Methodik) und in Abb.5 graphisch dargestellt.

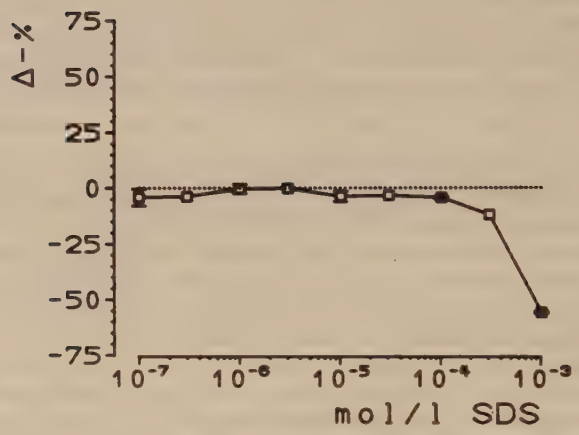


Abb.5

Einfluß von **Na-dodecylsulfat** (SDS) auf die Ultraschallfragilität von Erythrozyten. Es konnte kein Effekt von SDS auf die Fragilität nachgewiesen werden. Die Destabilisierung bei höheren Konzentrationen geht auf pharmakoninduzierte Hämolyse zurück (s. Text). Die Proben wurden einer fixen Beschallungszeit von 8 bzw. 10 sec unterworfen (entspricht den zu Versuchsbeginn ermittelten Halbwertszeiten aus den Kontrollmessungen ohne SDS). Untersucht wurden zwei Populationen aus Konservenblut.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins
(Meßwert minus Kontrollwert ohne SDS)

Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Methode erweist lediglich mit 1 mikromolarer Na-dodecylsulfat-Lösung eine auf dem 0.5%-Niveau signifikante destabilisierende Wirkung, die mehr als 55% beträgt. Auffällig sind noch eine Destabilisierung von etwa 4% in 0.1 millimolarer Wirkstofflösung, die aber nur auf dem 10%-Niveau signifikant wird, und eine von ca. 12% mit einer SDS-Konzentration von 0.3 µmol/l, für die wegen der Fallzahl 1 keine statistische Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben werden kann. Allerdings werden die letztgenannten schwachen Effekte eher durch die Kontrollmessung ohne SDS verursacht sein, deren Abweichungsfehler nach oben die Kurve nach unten verschiebt; dies läßt jedenfalls die graphische Darstellung vermuten.

b) indirekte Methode

Erythrozyten aus zwei ACD-Konserven wurden mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen vorbehandelt, die halbmaximal schädigende Beschallungszeit betrug für die zwei Individuen 9.6 und 6.1 sec. Die aus den angepaßten Kurven ermittelten Werte erbringen auf dem 5%-Niveau keine Signifikanz in stabilisierender oder destabilisierender Richtung, auch die größte gefundene positive Prozentverschiebung (von 4.6%) gegen die Kontrolle weist eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 40% auf. Zwar kann die Ursache dafür auch in der Fallzahl 2 gesehen werden; ob eine genauere Untersuchung mit vernünftigen Fallzahlen noch einen stabilisierenden Effekt aufzeigt, erscheint aber hinsichtlich minimaler Effekte in der Nachbarschaft des fraglichen Meßwerts (also um 50 µmol/l) zweifelhaft.

Für die Destabilisierung bei höheren SDS-Konzentrationen können die vorliegenden Ergebnisse auch keinen Anhalt liefern. Wie in der Diskussion der Methodik ausgeführt, sind die Berechnungen unter Ausschaltung der Vorhämolyse dann ungenau, wenn eine solche in größerem Umfang tatsächlich stattgefunden hat. Dies war bei den vorliegenden Versuchen mit Konzentrationen ab 0.2 mmol/l der Fall (über 90% pharmakoninduzierte Hämoglobinfreisetzung!). Dementsprechend sind die ermittelten Werte ab dieser Konzentration widersprüchlich (deutliche Destabilisierung neben fehlendem Effekt), so daß eine Beurteilung des von der pharmakoninduzierten Vorhämolyse unabhängigen destabilisierenden Effekts nicht sinnvoll ist und die Ergebnisse nicht graphisch dargestellt werden.

Der destabilisierende Effekt

In diesem Zusammenhang soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß bei dem direkten Verfahren mit fixer Beschallungszeit eine rechnerische Eliminierung der pharmakonbedingten Hämolyse nicht möglich ist, die dort vorgefundene Destabilisierung mit höheren SDS-Konzentrationen kann daher auch schon vor der Ultraschallbehandlung stattgefunden haben.

Berücksichtigt man nun die durch höhere SDS-Konzentrationen bedingte Vorhämolyse von über 90%, so kann dies allein schon die mit direkter Methode vorgefundene größte Prozentverschiebung von mehr als 55% gegenüber der Kontrolle ohne SDS erklären, da der Originalwert intrazellulären Hämoglobins der Kontrolle bei ungefähr 60% lag. Ob die wenigen noch übrigen Zellen nun auch noch zusätzlich eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Ultraschall besitzen, läßt sich daher mit diesen Ergebnissen nicht beantworten.

Wie wirkt **Stickstoff-Lost** auf Erythrozyten einer ca. 2 bis 3 Monate alten ACD-Konserve?

Inkubation von Erythrozyten mit trifunktionalem Stickstoff-Lost (HN3) zeigte keinen bedeutsamen Effekt auf deren Ultraschallfragilität im Vergleich zur Kontrolle ohne Pharmakon.

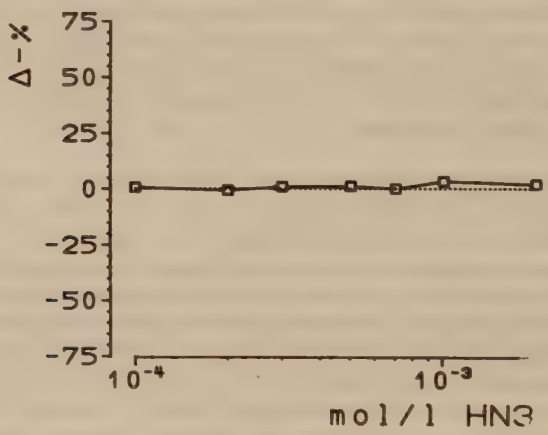


Abb.6

Kein nachweisbarer Einfluß von **trifunktionalem Stickstoff-Lost** (HN3) auf die Ultraschallfragilität von Erythrozyten aus einer überalterten ACD-Konserve. Die Prozentwerte wurden aus angepaßten einfachen e-Funktionen unter Berücksichtigung der pharmakoninduzierten Hämolyse errechnet.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins
(Meßwert minus Kontrollwert ohne HN3)

Verfahren und Versuchsauswertung sind analog zu den Versuchen mit Chlorpromazin (Kurvenanpassung, Prozentverschiebung gegen Kontrolle). Allerdings wurde hier nur ein Individuum untersucht, so daß für die einzelnen Konzentrationen keine mit den anderen Pharmakon-Tests vergleichbaren Parameter (Medianwert korrespondierender Meßpunkte, Interquantilsbereich) vorliegen.

Bei der Auswertung wurde daher wie beim Versuch mit variabler Osmolarität vorgegangen (vgl. dort), da für jede HN3-Verdünnung (wie auch für die beiden Kontrollen ohne Wirkstoffzugabe) mehrere Meßpunkte mit variierter Beschallungszeit vorlagen. Die korrespondierenden Punkte der beiden Kontrollen wurden gemittelt und als Referenzreihe gegen die Messungen mit HN3 benutzt. Der Student'sche Differenztest ließ sich nun wieder mit Hilfe der

normalisierten Meßpunkte ausführen (näheres s. Methodik unter: Signifikanztest mit angepaßten Funktionen) und so die Ergebnisse für eine bestimmte Wirkstoffkonzentration auf signifikanten Unterschied gegen die Werte ohne HN3 prüfen.

Dabei ergaben sich für 0.2 mmol/l und für 0.5 mmol/l Unterschiede mit 12- und 18-prozentiger, für 1 mmol/l und für 2 mmol/l mit 5- und 10-prozentiger Irrtumswahrscheinlichkeit; beim Vergleich der restlichen Daten wird P-alpha noch größer. Das sonst immer geforderte 5%-Signifikanzniveau wird also in keinem Fall erreicht. Die Prozentverschiebungen gegen die Kontrolle sind in Abb.6 graphisch dargestellt. Die halbmaximal vorschädigende Beschallungszeit betrug für die ca. 2 1/2 Monate alte ACD-Konserve 0.93 sec bei einer Amplitude von 4µ.

Wie ändert sich die Ultraschallfragilität von Erythrozyten in Suspensionsmedien **unterschiedlicher Viskosität**?

Die Ergebnisse lassen bei erhöhter Viskosität des Suspensionsmediums auf eine verminderte Empfindlichkeit der untersuchten Erythrozyten gegen Ultraschall schließen. Weiterhin zeigt der Verlauf der Meßpunkte mit steigender Viskosität zunehmende Ähnlichkeit mit einer doppelten e-Funktion (2-Kompartiment-Modell).

Für die in Abb.7 und 8 gezeigten Kurven wurden wiederholt Proben aus derselben ACD-Konserve entnommen. Die Ergebnisse mit normaler Viskosität (Suspension mit Hämatokrit 0.4% in PBS) stellen die drei mit "○", "△" und "□" markierten Kurven dar. Die Viskositäten von 5.5 cP und 11 cP wurden durch Zusatz von Polyhydroxyäthyl-Stärke eingestellt. Die Konzentration betrug 10- bzw. 20 Gewichtsprozent; vgl. hierzu auch Beschreibung der Viskositätsmessung. Für die Viskosität von 5.5 cP gelten die Kurven "▲" und "■", für 11 cP die Kurve "◆". Zum optischen Vergleich der jeweiligen Anpassungsgüte wird die Anpassung an die einfache (Abb.7) und die doppelte (Abb.8) e-Funktion vorgestellt. Vor allem bei der höchsten Viskosität ("◆") ergibt die doppelte e-Funktion die bessere Anpassung (d.h. geringeren Standardfehler der Schätzung, $s_{y.x}$; vgl. den Ausdruck der Kurvenparameter zu Abb.7 und 8), bei den beiden Kurven für 5.5 cP ist der Unterschied weniger ausgeprägt, während sich unter Normalbedingungen die einfache Funktion besser anpassen läßt.

Die Streuungsparameter der doppelten Funktion ließen allerdings nur bei Kurve "■" (5.5 cP) zwei Kompartimente auf dem 5%-Niveau gegen 0 und gegeneinander signifikant werden. Die anderen Messungen ergaben keine signifikanten Kompartimente bzw. für Kurve "□" nur eines. Demnach kann die Zwei-

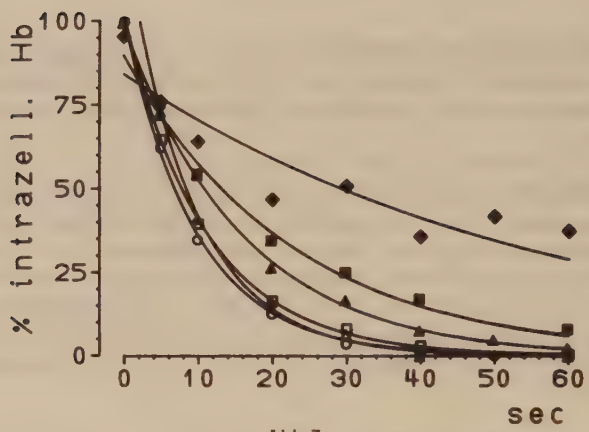


Abb.7

Einfluß der **Viskosität** des Suspensionsmediums auf die Ultraschallfragilität. Die Erythrozyten entstammen einer ACD-Konserve. Die Viskositätserhöhung erfolgte durch Zusatz von Hydroxyäthyl-Stärke (HÄS).

"○", "△", "□" = 1.0 cP; Puffer ohne Zusatz von HÄS
"▲", "■" = 5.5 cP; HÄS 10%
" " = 11.0 cP; HÄS 20%

An alle 6 Meßpunktreihen sind **einfache** e-Funktionen angepaßt.

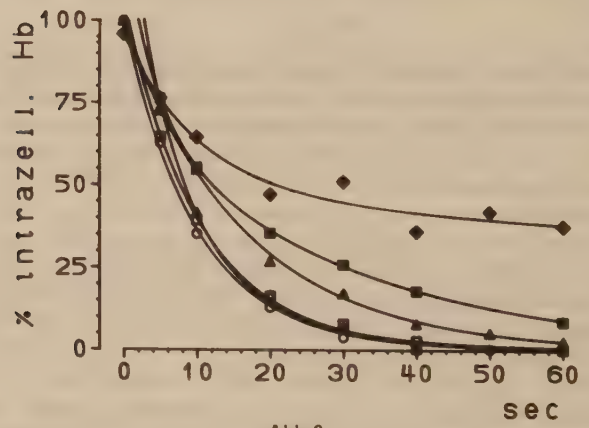


Abb.8

Einfluß der **Viskosität** des Suspensionsmediums auf die Ultraschallfragilität. Die Daten sind mit denen aus Abb.7 identisch; es wurden dieselben Symbole zur Markierung der Meßpunkte benutzt. An alle 6 Meßpunktreihen sind **doppelte** e-Funktionen angepaßt. Diese geben vor allem bei höherer Viskosität bessere Anpassungen als die einfache e-Funktion (vgl. Abb.7).

Kompartiment-Hypothese auch für höhere Viskositäten nur durch die bessere Anpassung und den optischen Eindruck des Verlaufs der Meßpunkte gestützt werden, einen Signifikanztest übersteht die Alternativhypothese aber (wohl wegen zu geringer Zahl der Meßpunkte) bis auf die genannte Ausnahme nicht.

Demgegenüber ergab Anpassung der einfachen e-Funktion für alle Meßreihen Signifikanz der Parameter Ao und a gegen 0 (p=0.05). Die Halbwertszeiten der untersuchten Ansätze mit den zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen sind hier noch einmal tabelliert:

Viskosität	Halbwertszeiten in sec (95%-Konfidenzintervall)		
	Versuch I	Versuch II	Versuch III
1 cP	7.6 (7.2-8.2)	6.3 (4.9-9.1)	6.7 (6.3-7.3)
5.5 cP	15.7 (13.7-18.5)	11.1 (10.5-11.7)	*
11 cP	38.8 (26.9-70.0)	*	*

* = nicht untersucht

Vergleicht man zwischen 2 Viskositätsstufen die größte Vertrauensbereichs-Obergrenze der niedrigeren Viskosität mit der kleinsten Vertrauensbereichs-Untergrenze der höheren Viskosität, so findet sich in keinem Fall eine Überlappung. Somit kann das Verhalten der Erythrozyten in den verschieden viskösen Medien als unterschiedlich betrachtet werden.

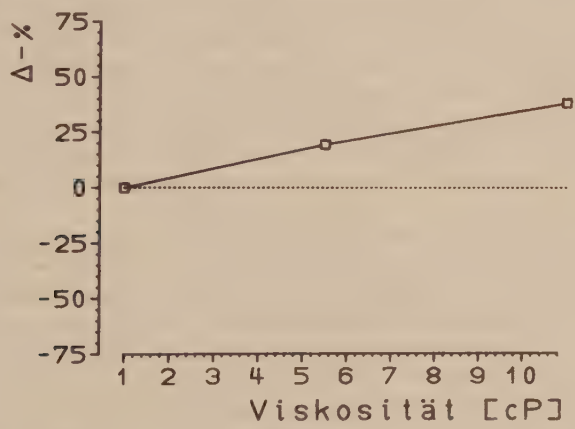


Abb.9

Stabilisierender Einfluß erhöhter **Viskosität** des Suspensionsmediums auf die Ultraschallfragilität. Transformierte Daten aus Abb.7: Die Prozentwerte wurden aus den angepaßten einfachen e-Funktionen errechnet. Die Daten gleicher Viskosität wurden gemittelt.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert mit 1 cP)

Abb.9 zeigt zusätzlich die gewohnte Darstellung der Prozentverschiebung gegenüber dem Mittelwert der drei Kontrollen ohne Stärkezusatz (Viskosität 1cP) in Abhängigkeit von der Viskosität, um den protektiven Effekt des höher viskösen Mediums zu verdeutlichen. Wie bei den anderen Untersuchungen wurden diese Werte durch Verarbeitung der angepaßten einfachen e-Funktionen unter Ausschaltung der Spontanhämolyse gewonnen.

VERSUCHSAUFBAU DER SCHERKRAFTMETHODE

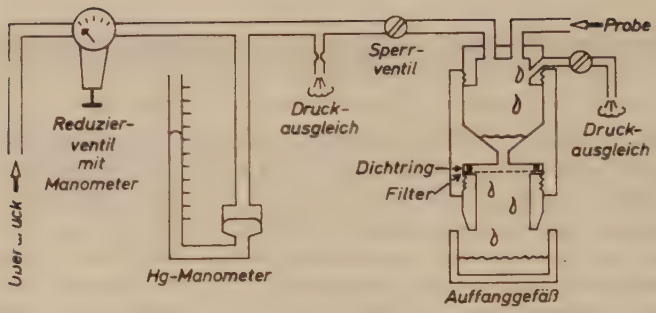
Mit dieser Methodik wird die mechanische Resistenz von Erythrozyten gegen Scherkräfte untersucht, die beim Durchfluß durch enge Porenkanäle auftreten. Vergleichbare Verfahren sind z.B. von Chien et al. (15) und Remien et al. (53) angewandt worden. Eine Suspension in PBS (Hämatokrit 1% oder 0.5%) wurde dabei mit Hilfe von Überdruck durchgepreßt. Meßparameter war die Freisetzung von Hämoglobin unter diversen Bedingungen, d.h. unter Änderung von Druckgradient, Osmolarität des Suspensionsmediums und Inkubation in verschieden konzentrierten Lösungen von Äthylendiamintetraessigsäure, Chlorpromazin, Chlorpromazin-Methojodid, Natrium-dodecylsulfat und Natrium-Thiopental.

Versuchsanordnung

Für die Untersuchung der mechanischen Resistenz der Erythrozyten wurden Polycarbonat-Filter der Fa. Nucleopore (Pleasanton, Calif.) verwendet. Sie hatten eine Dicke von 10µ und Porendurchmesser von 3µ. Die Poren wurden in einem Kernreaktor durch Beschuß mit Nukliden aus ^{235}U-Zerfällen und Ätzung des so vorgeschädigten Materials mit starker Lauge hergestellt, wobei eine zufällige Verteilung auf der Filteroberfläche mit einer Dichte von $2*10^6$ Poren/mm^2 entsteht. Dabei muß in Kauf genommen werden, daß die Einschußlöcher sich teilweise überlappen. Der Anteil solcher "Doppelporen" wurde durch Mikroskopieren auf etwa 10% geschätzt. Die Ausrichtung der Porenkanäle ist laut Prospekt des Herstellers "annähernd parallel", über eine dadurch verursachte Streuung ihrer Länge liegen keine Angaben vor; die Schwankung der Filterdicke sei kleiner als 5%; der aktuelle Porendurchmesser variiere um +0% bis -20% des Nennwerts.

Die Filter waren an der Unterseite eines Plexiglas-Gefäßes montiert (siehe Zeichnung); der Durchlauf der Erythrozytensuspensionen konnte direkt beobachtet werden. Die durchgepreßte Probenflüssigkeit lief frei in ein Auffanggefäß (Eppendorf-Cup), so daß der eingestellte Überdruck voll als Druckdifferenz entlang der ca. 10µ langen Poren wirksam wurde.

Der Druck wurde aus der hauseigenen Preßluftleitung oder aus einer Carbogen-Flasche (95 % O_2, 5 % CO_2) gewonnen. Zwischen druckzuführender Leitung und Probengefäß befand sich ein Absperrventil, wodurch zunächst der Überdruck unter Manometerkontrolle eingestellt werden konnte, bevor er am Filter wirksam wurde. Der Druckausgleich ging genügend schnell im Vergleich zur Filtrationsdauer vor sich, so daß über die Zeit ein nahezu rechteckiger Druckverlauf angenommen wurde.



Aufbau zur Filtration von
Erythrozytensuspensionen

Die Messungen mit Filtern von 5µ Porendurchmesser (ebenfalls Fa. Nucleopore) erbrachten bei Frischblut in isotonem Medium nur einen geringen hämolytischen Effekt (weniger als 5% Hämolyse bei 500 mm Hg), so daß eine Verwertung dieser Daten nicht sinnvoll erschien. Lediglich Erythrozyten aus einer überalterten ACD-Konserve zeigten bei 100 mm Hg Hämolyse bis zu 25%. Zur Ermittlung der vorgestellten Ergebnisse fanden daher nur Filter mit 3µ Porendurchmesser Verwendung.

Ausführung

Es wurden jeweils ca. 1 ml Suspension gewaschener Erythrozyten mit Hämatokrit 1% in das Überdruckgefäß eingefüllt, der gewünschte Druck eingestellt, das Ventil zum Druckgefäß geöffnet und der vollständige Durchfluß der Suspension abgewartet. Die Messungen mit variablem Druck erfolgten immer mit schrittweise steigender Druckdifferenz, um einer Kontamination der folgenden Probe durch freigesetztes Hämoglobin vorzubeugen. Vor jeder neuen Meßreihe wurde mit Wasser und PBS vorgespült. Für die einzelne Reihe kamen Druckdifferenzen von 0 bis 100 oder 500 mm Hg zur Anwendung. Die Angabe "Druckdifferenz 0 mm Hg" bedeutet Kontrolle ohne Filterpassage.

Bei den Tests mit erniedrigter Osmolarität wurde zunächst der Hämatokrit 1% eingestellt, dann das gleiche Volumen eines geeigneten Gemisches aus Wasser und PBS zugefügt, um einen Hämatokrit von 0.5% und das gewünschte hypotone Medium zu erhalten. Das Mischungsverhältnis Puffer/Wasser errechnet sich aus der Beziehung:

$$\frac{Vp}{Vw} = \frac{Op - 160}{320 - Op}$$

Vp = Volumen Puffer
Vw = Volumen Wasser
Op = gewünschte Osmolarität des Probenmediums in mosmol/l.

Standard

Der 100% Standard wurde durch Einlegen mehrerer Proben gleichen Hämatokritwerts in den Tiefkühlraum bei -22°C für mindestens eine Stunde, anschließendes Auftauen und Zentrifugieren erhalten. Zur Überprüfung wurden noch 2 bis 3 mal je 0.1 ml Suspension zu 0.9 ml Wasser pipettiert und der abgelesene Extinktionswert mit 10 multipliziert.

Messung der Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die Meßreihen wurden ohne Pharmakon zur Kontrolle in isotonem und in verschieden hypotonem Suspensionsmedium durchgeführt und unter gleichen Bedingungen nach Inkubation mit diversen Substanzen wiederholt. Durch Anpassung einer einfachen e-Funktion an die Meßpunkte (Druckgradient, Prozent Hb) läßt sich ein "Halbwertsdruck", der die Hälfte des eingebrachten intrazellulären Hämoglobins zerstört (siehe Kap. "Auswertung"), als Parameter für die Empfindlichkeit der Zellpopulation unter den jeweiligen Bedingungen (normale oder erniedrigte Osmolarität, verschiedene Wirkstoffkonzentrationen) angeben.

Zur Messung des Effekts der benutzten Pharmaka kamen vier verschiedene Versuchsprinzipien zur Anwendung:

1) Messung mit variablem Druckgradienten in Medien unterschiedlicher Osmolarität

Nach Herstellung der verschieden osmolaren Suspensionsmedien (300 bis 200 mosmol/l) wie oben beschrieben folgte Filtration, Messung, Kurvenanpassung und Berechnung des Halbwertsdruckes.

2) Messung mit variabler Osmolarität bei konstantem Druckgradienten

Bei diesen Versuchen wurde immer ein Druck von 150 mm Hg gewählt, weil dabei im isotonen Medium nur etwa 10% bis 20% der Erythrozyten zerstört werden, bei der niedrigsten angewandten Osmolarität (200 mosmol/l) dagegen 80% bis 90%. Die Mittelung mehrerer gleichartiger Messreihen erfolgte durch Bildung des Medianwertes aus den korrespondierenden Meßpunkten.

3) Messung in hypotonem Medium bei variabler Wirkstoffkonzentration und konstantem Druck

Dieses Vorgehen erforderte zunächst die Bestimmung der Parameter für eine halbmaximale Vorschädigung der Zellpopulation:

Zum einen wurden dafür einige Meßreihen ohne Pharmakon mit variablem Druck jeweils in unterschiedlich osmolarem Medium (z.B. 320 bis 240 mosmol/l) durchgeführt. Die für jede Osmolarität eigens berechneten Halbwertsdrucke ließen dann unter mehreren halbmaximal schädigenden Kombinationen von Druck und Tonizität die Auswahl.

Als ebenso tauglich erwies sich aber das Vorgehen unter 2), so daß wegen des geringeren Aufwandes (Mittelung aus 2 Reihen ergab zuverlässige Ergebnisse) zumeist dieses benutzt wurde. Es gab keine Veranlassung, den praktikablen Druckgradienten von 150 mm Hg zu ändern.

Die so bestimmten Parameter der halbmaximalen Vorschädigung, Druck und Osmolarität, wurden dann konstant gehalten und eine Meßreihe nach Inkubation mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen durchgeführt, um eine eventuelle Veränderung des intrazellulär verbliebenen Hämoglobins unter Einfluß des Pharmakons festzustellen.

4) Messung in iso- oder hypotonem Medium mit variablem Druckgradienten und jeweils einer Konzentration

Dabei wurden zunächst eine oder mehrere Kontrollreihen ohne Pharmakon gemessen, um die Empfindlichkeit des Individuums zu ermitteln. Es folgten dann mehrere Reihen, nachdem die Erythrozytensuspensionen mit jeweils einer bestimmten Wirkstoffkonzentration inkubiert worden waren. Auch hier diente nach erfolgter Kurvenanpassung der Halbwertsdruck als Parameter für die Empfindlichkeit des Individuums bzw. für den protektiven oder destabilisierenden Effekt des Pharmakons in Abhängigkeit von der angewandten Konzentration.

ERGEBNISSE DER SCHERKRAFTMETHODE

Wie verläuft die Hämoglobinfreisetzung, wenn Erythrozyten mit **variablem Druckgradienten** durch enge Filterkanäle gepreßt werden?

Ähnlich wie bei Anwendung von Ultraschall fiel auch bei diesen Versuchen eine exponentielle Abnahme des Prozentsatzes intrazellulären Hämoglobins in Abhängigkeit vom steigenden Druckgradienten im ca. 11μ langen und 3μ dicken Filterkanal auf. Allerdings war die Anpassung einer einfachen e-Funktion an die Meßdaten in einigen Fällen unbefriedigend, bei denen dann mit einer doppelten e-Funktion eine höhere Güte der Anpassung erzielt werden konnte. Dies deutet auf die Existenz zweier verschieden empfindlicher Untergruppen in den betreffenden Erythrozytensuspensionen hin, wobei jeder von beiden ein eigener halbmaximal schädigender Druckwert ("Halbwertsdruck") als Eigenschaft des jeweiligen Kompartiments zuzuordnen ist.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die Aufspaltung einer Population in Untergruppen dann anzunehmen ist, wenn die Individuen infolge ihrer Vorgeschichte eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Scherkräfte aufweisen. Normale Erythrozyten hingegen verhalten sich im untersuchten Druckbereich bis 500 mm Hg homogen, es findet sich hier kein Anhalt zur Ablehnung des Ein-Kompartiment-Modells.

Signifikanz der angepaßten Funktionsparameter

Zur Ermittlung der Gesetzmäßigkeiten des druckabhängigen Verhaltens der Zellpopulationen wurden an 69 einzelne Meßreihen (Prozent intakte Erythrozyten gegen angewandten Druck) sowohl einfache als auch doppelte e-Funktionen angepaßt. Bei 32 Kurven mit nur 4 Stützpunkten ließ sich das Anpassungsverfahren an 4 Parameter zwar grundsätzlich durchführen, wegen 0 Freiheitsgraden aber keine Streuung berechnen, so daß ein Test auf Signifikanz der Parameter hinfällig wird. Weitere 18 Messungen mit 3μ-Filterporen erbrachten 6 Stützpunkte für die Kurvenanpassung, was nur 2 Freiheitsgraden entspricht. Die letzten 19 Funktionen konnten an 10 Punkte angepaßt werden (6 Freiheitsgrade).

Vor allem bei Versuchen mit stärker schädigendem Agens oder erhöhter Empfindlichkeit der Zellpopulation (verfallene Konserve) ließ sich mit der Anpassung einer doppelten e-Funktion eine niedrigere Restvarianz erzielen. Trotz höherer Güte der Anpassung erreichten aber nur 6 von 37 Tests auf das Zwei-

Kompartiment-Modell die gleichzeitige Signifikanz aller vier angepaßten Parameter (näheres s. Methodik und untenstehende Tabelle), wohl wegen der für diesen Zweck zu kleinen Fallzahl.

Eine tabellarische Summierung der Signifikanzereignisse der vier angepaßten Parameter aller Messungen mit variablem Druck soll dies näher erläutern. Da ein einzelnes Kompartiment ($Ao * e^{-a*x}$) von den Parametern Ao und a definiert wird, bestehen die Kombinationsmöglichkeiten Nicht-Signifikanz, Signifikanz nur der Abszissenparallelen Ao und Signifikanz des ganzen Kompartiments (vgl. "Kurvenanpassung"). Alleinige Signifikanz von a gegen 0 ist unbedeutend wegen Ao=0 (Faktor 0 vor Exponentialausdruck!).

Verfährt man nun entsprechend mit Kompartiment B und vernachlässigt die (ohnehin nicht vorgekommene) Möglichkeit der alleinigen Signifikanz von zwei Abszissenparallelen, so ergeben sich insgesamt 5 sinnvolle Kombinationen von Signifikanz und Nicht-Signifikanz der 4 Parameter des Zwei-Kompartiment-Modells. In untenstehender Tabelle sind die Anzahlen der Signifikanzereignisse für jede Kombination angeführt. Im Fall der Signifikanz zweier Kompartimente (K=2) waren diese auch gegeneinander signifikant.

	Fallzahl	K=0	Ap	K=1	K=1;Ap	K=2
gesamt	37	8	5	12	6	6
normal	19	5	2	8	3	1
empfdl.	18	3	3	4	3	5

Ap : Abszissenparallele ist signifikant
K : Kompartimente, wobei 0, 1 oder 2 signifikant sein können

Es sind hier die 37 angepaßten Kurven mit 6 oder 10 Stützpunkten zusammengefaßt. Die Versuche wurden zusätzlich aufgeteilt in Populationen mit normaler und mit erhöhter Empfindlichkeit gegen Scherkräfte. Zur Gruppe "empfindlich" wurde zugeordnet, wenn die Zellen aus einer überalterten ACD-Konserve stammten (vgl. Abb.10), in einem Medium mit einer Osmolarität von 260 mosmol/l oder weniger suspendiert waren oder mit Wirkstoffkonzentrationen von mindestens 0.1 mmol/l Chlorpromazin, 0.7 mmol/l Na-dodecylsulfat oder 0.02 mol/l Thiazinamium inkubiert worden waren.

Diese Tabelle zeigt zum einen, daß das Ein-Kompartiment-Modell für Erythrozytenpopulationen mit normaler Empfindlichkeit bevorzugt signifikant wird. Sind die Zellen dagegen durch Altern, hypotone Suspension oder destabilisierende Wirkstoffkonzentrationen empfindlicher gegen Scherkräfte, verliert sich diese Bevorzugung möglicherweise zugunsten des Zwei-Kompartiment-Modells.

Eine Bestätigung dieser Vermutung würde aber eine größere Anzahl untersuchter Individuen voraussetzen. Außerdem sollte die Zahl der Stützpunkte für die einzelne Anpassung genügend groß sein, d.h. nach Meinung des Verfassers größer als 14, um mehr als 10 Freiheitsgrade zu erreichen und dadurch die hier sicher sehr große Wahrscheinlichkeit des beta-Fehlers (falsch negativ) auf ein tolerables Maß zu reduzieren. Eine eventuelle Richtigkeit des Zwei-Kompartiment-Modells wird dann auch leichter Signifikanz ergeben. Weiteres hierzu siehe Diskussion unter: "Die Hämoglobinfreisetzung als Funktion des Druckgradienten".

Wie verläuft die Hämoglobinfreisetzung bei **frisch** gespendeten Erythrozyten im Vergleich mit solchen aus einer **überalterten** ACD-Konserve?

Bei Anwendung variabler Druckdifferenz an Filtern mit 3 μ Porendurchmesser auf isotone Erythrozytensuspensionen ohne Wirkstoffzusatz zeigen die Ergebnisse für Frischblut die Gültigkeit des Ein-Kompartiment-Modells. Hingegen kann für überaltertes Konservenblut (ca. 3 Monate im Kühlschrank aufbewahrt) das Zwei-Kompartiment-Modell angenommen werden.

Die Prozente intrazellulären Hämoglobins in Abhängigkeit vom angewandten Druck mit den Streuungsparametern (0.25- und 0.5-Quantil) sowie die angepaßten Kurven sind in Abb.10 dargestellt. Dabei steht Kurve "□" (Anpassungsverfahren: einfache e-Funktion) für Frischblut und Kurve "◇" (doppelte e-Funktion) für überalterte Konserven. Als Maß für die Empfindlichkeit der Frischblutpopulationen gegen Scherkräfte im Filterkanal findet sich eine halbmaximal schädigende Druckdifferenz von 736 (95%-Konfidenzintervall 669 bis 818) mm Hg. Die zur Abbildung gehörige Auflistung der angepaßten Parameter zeigt durch Ao, daß das gewählte Modell für 98 ± 2% der ursprünglich eingesetzten Population zutrifft. Der Rest von ca. 2% war im Rahmen der Vorbehandlung durch Spontanhämolyse bereits zerstört worden.

Der Verlauf von Kurve "◇" in Abb.10 zeigt einerseits die deutlich erhöhte Empfindlichkeit der Erythrozyten aus einer überalterten ACD-Konserve im Vergleich zu Frischblut. Zum anderen spricht der im Niedrigdruckbereich relativ zu einer einfachen e-Funktion zunächst steilere, dann mit höheren Drucken relativ flacher werdende Verlauf für die Annahme von zwei Kompartimenten. Das eine mit einem Halbwertsdruck von 45 mm Hg betrifft 81 ± 19% der Population, das andere mit $P_{1/2}$ = 281 mm Hg dagegen 23 ± 18.5% (vgl. hierzu die zugehörige Auflistung der angepaßten Parameter bei Abb.10).

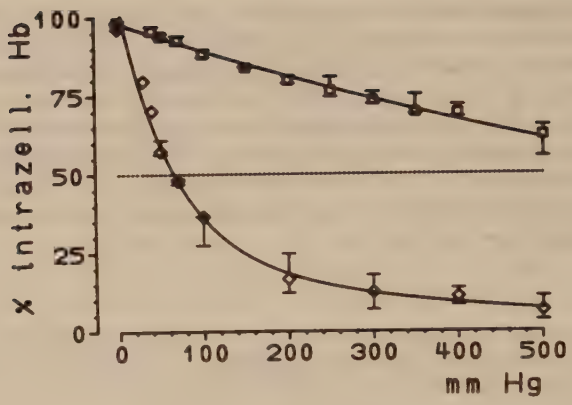


Abb.10

Prozent intrazellulär verbliebenes Hämoglobin in Abhängigkeit von der **Druckdifferenz am Filter.** Die Erythrozyten einer ACD-Konserve, die das angegebene Verfallsdatum um etwa 2 Monate überschritten hatte, zeigen eine deutlich verminderte Resistenz gegenüber Scherkräften im Vergleich zu frisch gespendeten Zellen. Horizontale Markierungen begrenzen den 50%-Interquantilsbereich. An die mit Frischblut erhobenen Daten wurde eine einfache e-Funktion der Form $Y = Ao * e^{-a*x}$, an die Ergebnisse mit Konservenblut eine doppelte e-Funktion der Form $Y = Ao * e^{-a*x} + Bo * e^{-b*x}$ angepaßt.

"□" = frisch gespendete Erythrozyten von 17 gesunden Spendern
"◇" = 7 Versuchsreihen mit Erythrozyten der überalterten Konserve

Frischblut:

Parameter:	$Ao = 98.02$	$a = 0.0009418$
Standardabw.:	$s_{Ao} = 1.006$	$s_a = 0.00004826$
Halbwertsdruck:	$P_{1/2} = 736$ mm Hg (95%-Konfidenzintervall: 669 bis 818)	

Konserve

Parameter:	$Ao = 81.09$	$a = 0.01531$
	$Bo = 23.21$	$b = 0.002468$
Standardabw.:	$s_{Ao} = 9.922$	$s_a = 0.003583$
	$s_{Bo} = 9.450$	$s_b = 0.0009125$
Halbwertsdruck$_a$:	$P_{1/2} = 45.27$ mm Hg (95%-Konfidenzintervall: 31.03 bis 83.6)	
Halbwertsdruck$_b$:	$P_{1/2} = 280.8$ mm Hg (95%-Konfidenzintervall: 163 bis 1020)	

Herkunft der Erythrozyten und Datenauswertung

Die Abb.10 zeigt Anpassungen an die Mediane der Meßwerte aller Versuche mit der Scherkraftmethode ohne Pharmakonzugabe und mit variablem Druckgradienten im Filterkanal. Kurve "□" entstand unter Verwendung von Frischblut 17 ver-

schiedener Individuen. Für Kurve "◇" wurde Blut aus einer ACD-Konserve entnommen, die das angegebene Verfallsdatum um etwa 2 Monate überschritten hatte. Die Entnahme fand an 7 verschiedenen Versuchstagen jeweils unter Bereitung einer frischen Suspension statt.

Paßt man die mit Frischblut erhaltenen Daten an eine doppelte e-Funktion an, so sind die dadurch berechneten Parameter Ao und a auf dem 5%-Niveau nicht signifikant von 0 verschieden. Ein 2-Kompartiment-Modell wird also durch die Meßpunkte nicht bestätigt. Das Kompartiment A mit seinem relativ niedrigen Halbwertsdruck von 67 mm Hg (steiler Verlaufsteil) wäre auch nur zu etwa 6% am Modell beteiligt gewesen (Ao = 6.16). Die Parameter des Kompartiments B sind dagegen beide von 0 verschieden ($p \leq 0.05$). Dieses zweite Kompartiment betrifft praktisch alle eingebrachten Erythrozyten (d.h. 93 ± 10% der Gesamtpopulation); der Halbwertsdruck beträgt 862 mm Hg (95%-Konfidenzintervall von 668 bis 1214). Auch die Anpassung der mit Frischblut erhobenen Daten an eine doppelte e-Funktion stützt demnach die Gültigkeit eines einzigen Kompartimentes, zumal die für das zweite (allein signifikante) Kompartiment ermittelten Parameter nicht weit entfernt von den oben bereits genannten Größen der einfachen e-Funktion liegen.

Demgemäß kann für Frischblut unter Normalbedingungen das Modell der doppelten e-Funktion nicht aufrechterhalten werden. Bei den Erythrozyten aus der verfallenen ACD-Konserve hingegen sind alle vier Parameter mit $p \leq 0.05$ signifikant gegen 0. Hier kann das Zwei-Kompartiment-Modell angenommen werden.

Wie wirkt Veränderung der **Osmolarität** des Suspensionsmediums auf die mechanische Resistenz von Erythrozyten; besteht dabei ein Unterschied zwischen **Frisch-** und **Konserven**blut?

Nach Filtration mit konstantem Druck findet man im Bereich von 200 bis 300 mOsm eine hohe positive lineare Korrelation zwischen Osmolarität des Suspensionsmediums und intrazellulär verbliebenem Hämoglobin (Abb.11). Die Steilheit der Regressionsgeraden dient als Vergleichsmaß für die Empfindlichkeit: sie ist Ausdruck für die Größe des Einflusses einer Osmolaritätsveränderung auf die mechanische Resistenz der Erythrozyten. So zeigen die Regressionskoeffizienten eine signifikant verminderte Empfindlichkeit der Erythrozyten aus einer ACD-Konserve im Vergleich zu denen eines Frischblutspenders.

Nach Filtration mit variablem Druck findet man mit frisch gespendeten Erythrozyten eine vergleichbare Abhängigkeit von der Osmolarität wie oben, der Verlauf ist aber eher sigmoid (Abb.11).

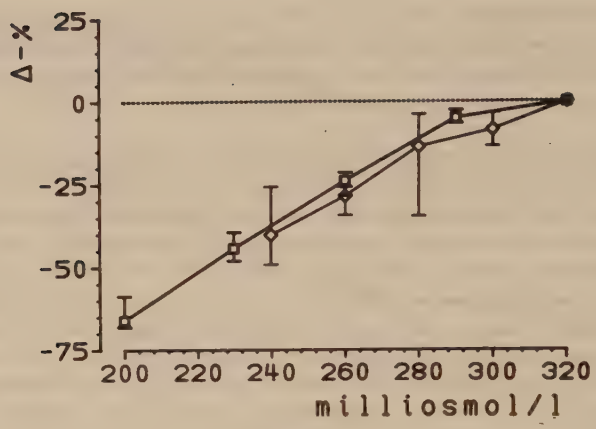


Abb.11

Einfluß der **Osmolarität** des Suspensionsmediums auf die Empfindlichkeit von Erythrozyten gegen Scherkräfte. Unterhalb von 300 mOsm wird eine lineare Abhängigkeit der Empfindlichkeit erkennbar. Die Erythrozyten wurden frisch gespendet oder stammten aus frischer ACD-Konserve.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert mit 320 mOsm)

"□" = Messung mit fest eingestellter Druckdifferenz von 150 mm Hg

"◇" = Messung mit variabler Druckdifferenz; Prozentwerte aus angepaßten einfachen e-Funktionen unter Berücksichtigung der osmotischen Hämolyse errechnet

"●" = Kontrollwert mit 320 mOsm gemessen

Die untersuchten Suspensionen

Mit insgesamt 15 Versuchsansätzen wurde die Beziehung zwischen der Osmolarität in Milliosmol/l und dem intrazellulär verbliebenen Hämoglobin ermittelt. Bei 7 wurde mit Medien unterschiedlicher Osmolarität bei konstantem Druck von 150 mm Hg gemessen ("direkte Methode"). Es fanden pro Ansatz ein bis zwei Meßreihen statt. In letzterem Fall gilt das arithmetische Mittel der korrespondierenden Punkte. Es handelt sich um 4 Untersuchungen derselben ACD-Konserve und um 3 Versuche mit derselben gewaschenen Erythrozytensuspension eines Frischblutspenders, alle an verschiedenen Versuchstagen.

Bei den anderen 8 Versuchsansätzen (Erythrozyten verschiedener Frischblutspender, Verarbeitung am Tage der Entnahme) wurde zunächst für jede Osmolaritätsstufe mit variablem Druck gemessen und eine einfache e-Funktion an die Meßpunkte angepaßt. Aus diesen Funktionen ließ sich dann durch Einsetzen eines bestimmten Druckwertes ein Prozentwert intrazellulären Hämoglobins

errechnen und der betreffenden Osmolarität zuordnen; eine eventuelle hypotone Vorhämolyse ist dabei berücksichtigt worden (s. Methodik). Der fragliche Druckwert wurde analog zur Ultraschallmethode aus der Anpassung für isotone Suspension gewonnen. Er stellt die Druckdifferenz dar, bei der Erythrozyten halbmaximal geschädigt werden ("Halbwertsdruck") und dient somit als Normgröße für eine Erythrozytenpopulation.

Graphische Darstellung

In Abb.11 sind die Mediane der korrespondierenden Punkte der 7 Messungen mit fest eingestellter Druckdifferenz von 150 mm Hg mit "□" gekennzeichnet. Die aus den angepaßten Kurven unter Korrektur der Vorhämolyse erhaltenen, mit "◇" bezeichneten Werte zeigen die Mittelung der 8 Frischblut-Versuche. Der mit isotonem Medium (320 mosmol/l) gefundene Prozentwert bestimmt den Nullpunkt der Prozentskala; die Ordinate repräsentiert damit die Prozentdifferenz zur isotonen Kontrolle. Im Gegensatz zum streng linearen Verlauf von "□" ist bei "◇" ein sigmoider Verlauf angedeutet.

Welchen Einfluß hat die **Aufbewahrungsdauer** von Erythrozyten auf deren Empfindlichkeit gegen Veränderung der Osmolarität des Suspensionsmediums vor der mechanischen Belastung?

Während der Aufbewahrung der ACD-Konserve fiel eine Empfindlichkeitszunahme in den ersten zwei Wochen auf. Am 18. Tag sank die Empfindlichkeit unter das Niveau des ersten Tages ab. Bei Frischblut dagegen nahm die Empfindlichkeit im Verlauf von 3 Tagen ab, ohne daß zwischendurch eine Erhöhung beobachtet wurde.

Erythrozyten aus der ACD-Konserve

Aus einer frischen ACD-Konserve wurden an vier verschiedenen Tagen (Konservenalter 1, 5, 14, 18 Tage) Proben entnommen und jeweils neue Ansätze bereitet. Bei allen vier wurde mit konstanter Druckdifferenz von 150 mm Hg der Zusammenhang zwischen Osmolarität und intrazellulär verbliebenem Hämoglobin gemessen. Unterschiede zwischen den verschieden alten Erythrozytenpopulationen konnten hinsichtlich der Steilheit der Regressionsgeraden registriert werden, die als Parameter für die Empfindlichkeit der Erythrozyten dient (siehe vorangegangene Fragestellung). Das Signifikanzniveau dieser Unterschiede ist der Tabelle unter P-alpha zu entnehmen (s. unten); es bezieht sich auf den Vergleich zweier zeitlich benachbarter Messungen.

Die untersuchten Zellen wurden bis zum 14. Aufbewahrungstag zunächst empfindlicher, um dann nach 18 Tagen wieder unempfindlicher als am 1. Tag zu werden. Dies zeigt die Tabelle der Regressionskoeffizienten mit den Streuungsdaten. Über die Bestimmung des Prüfmaßes t siehe Methodik.

Alter (Tage):	1		5		14		18
Steilheit:	0.60		0.63		0.69		0.49
±Standardabw.:	±0.0013		±0.0013		±0.0010		±0.0076
$s_{y.x}$	0.878		0.839		0.652		5.109
t		1.79		3.64		2.65	
P-alpha		15%		2.2%		5.7%	

Die Annahme eines Unterschieds zwischen jüngsten und ältesten Zellen hat eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 42% (t=0.91). Für alle Angaben gelten 4 Freiheitsgrade.

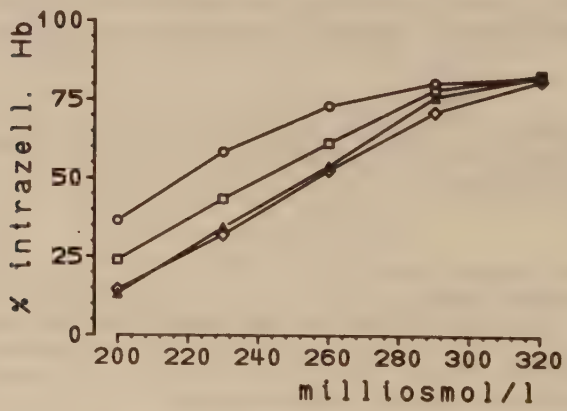


Abb.12

Einfluß der **Aufbewahrungsdauer** auf die osmolaritätsabhängige Scherkraftempfindlichkeit von Erythrozyten einer frischen **ACD-Konserve.** Nach 5 Tagen Aufbewahrung zeigt sich zunächst ein Anstieg der Hämoglobinfreisetzung gegenüber dem Ausgangswert am 1. Tag. Bis zum 14. Tag ändert sich dann nahezu nichts; am 18. Tag jedoch findet sich noch mehr intrazelluläres Hämoglobin als zu Beginn. Die Messungen wurden mit konstanter Druckdifferenz von 150 mm Hg durchgeführt.

"□", "◇", "△", "○" = 1, 5, 14 und 18 Tage nach Blutentnahme

Ein ähnliches Verhalten wie der Regressionskoeffizient zeigt der Absolutbetrag intrazellulären Hämoglobins (Abb.12). Nach 5 Tagen Aufbewahrung wird zunächst deutlich mehr Hämoglobin bei gleicher Hypotonizität freigesetzt. Bis zum 14. Tag ändert sich dann praktisch nichts; am 18. Tag jedoch findet sich noch mehr intrazelluläres Hämoglobin als am 1. Tag. Die im isotonen Medium gemessenen Werte weisen so gut wie keine altersabhängigen Schwankungen auf.

Erythrozyten eines Frischblutspenders

Die Untersuchung erfolgte wie bei der Konserve mit konstanter Druckdifferenz von 150 mm Hg. Die Erythrozyten entstammten einer einzigen Blutentnahme bei einem männlichen Spender. Sie wurden an drei verschiedenen Versuchstagen (0, 1 und 3 nach Entnahme) untersucht; die gewaschene filterfertige Zellsuspension lagerte zwischenzeitlich im Kühlschrank bei ca. 5°C. Wie bei Konservenblut wird auch für Frischblut die sich ändernde Empfindlichkeit in Form der Regressionskoeffizienten zusammen mit den Streuungsdaten tabellarisch dargestellt.

Alter (Tage):	0		1		3
Steilheit:	0.73		0.68		0.66
±Standardabw.:	±0.0019		±0.0012		±0.0014
$s_{y.x}$	1.304		0.830		0.959
t		1.90		1.38	
P-alpha		13%		24%	

Die Annahme eines Unterschiedes zwischen 0 und 3 Tagen Aufbewahrung hat eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 4.4% (t=2.90) bei 4 Freiheitsgraden. Abb.13 zeigt den Absolutbetrag intrazellulären Hämoglobins. Dieser Parameter weist eine ähnliche Zeitabhängigkeit wie der Regressionskoeffizient auf. Ein übereinstimmendes Verhalten der beiden Größen wird also bei Frisch- wie bei Konservenblut gefunden.

Unterschiede zwischen Frisch- und Konservenblut

Bildet man aus den jeweiligen korrespondierenden Meßpunkten der 4 Konserven- und der 3 Frischblutansätze die Medianwerte und vergleicht die Steilheit der beiden neuen Regressionsgeraden, so ergibt sich für Konservenblut ein Koeffizient von 0.63±0.0004 ($s_{y.x}$=0.266) und für Frischblut von 0.68±0.0016 ($s_{y.x}$=1.051) und somit eine höhere Empfindlichkeit des letzteren. Der Unterschied liegt auf dem 4.3%-Signifikanzniveau (t=2.92, 4 Freiheitsgrade).

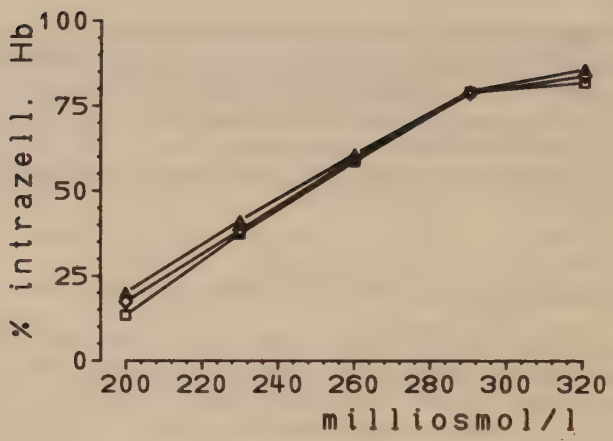


Abb.13

Einfluß der **Aufbewahrungsdauer** auf die osmolaritätsabhängige Scherkraftempfindlichkeit von **frisch gespendeten** Erythrozyten. Es zeigt sich nur eine geringe Stabilisierung im Verlauf von 3 Tagen. Die Unterschiede sind entsprechend der kürzeren Beobachtungszeit geringer als bei Konservenblut (Abb.12). Die Messungen wurden mit konstanter Druckdifferenz von 150 mm Hg durchgeführt.

"□", "◇", "△" = 0, 1 und 3 Tage nach Blutentnahme

Wie wirkt **Dinatrium-Äthylendiamintetraessigsäure** auf die mechanische Resistenz von Erythrozyten aus Frischblut und aus einer überalterten ACD-Konserve?

Es konnte keine eindeutige destabilisierende Wirkung von Na_2-Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) auf die mechanische Resistenz nachgewiesen werden. Abb.14 zeigt den Einfluß des Wirkstoffs auf die Hämoglobinfreisetzung aus Erythrozyten von zwei Frischblutspendern (Kurve "□") und einer ACD-Konserve, die das angegebene Verfallsdatum um etwa 3 Monate überschritten hatte (Kurve "◇").

Wenn der durch EDTA verursachte "anti-resealing"-Effekt Einfluß auf die Hämoglobinfreigabe besitzt, muß sich dies durch Verschiebung der Meßpunkte nach unten ausdrücken. Tatsächlich findet sich aber bei den Erythrozyten der überalterten Konserve eine augenfällige Stabilisierung. Für die frisch gespendeten Zellen ist das Resultat je nach Konzentration verschieden. An beiden Kurven fällt eine leichte Destabilisierung in Richtung höherer EDTA-Konzentration auf. Eine statistische Aussage, auch über den Unterschied

zwischen "frisch" und "verfallen", ist wegen der geringen Fallzahl nicht möglich. Die "Nullinie" wird jedenfalls nicht deutlich unterschritten; eine wesentliche Destabilisierung als Folge eines "anti-resealing"-Effekts kann also nicht angenommen werden.

Die in Abb.14 gezeigten Ergebnisse entstanden durch Messung mit variablem Druck und Kurvenanpassung wie bisher beschrieben. Der halbmaximal schädigende Druck betrug bei Erythrozyten ohne EDTA-Zusatz 932 und 755 mm Hg für Frisch-, 68 mm Hg für überaltertes Konservenblut. Bei der "Frischblutkurve" wurden eine Messreihe mit vier Konzentrationen und eine mit nur zwei (0.5 und 5 mmol/l) mit den Medianwertprogrammen zusammengefaßt. Dementsprechend stellen die beiden auf der x-Achse äußersten Punkte den Mittelwert und die zugehörigen waagrechten Striche die Originalpunkte dar (siehe unter Methodik, "Medianwerte und Interquantilsbereich"). Für Konservenblut wurde hier nur ein Individuum untersucht. Da aber jeder Prozentwert durch Kurvenanpassung mit mehreren Stützpunkten berechnet wurde, haben alle Daten den Stellenwert von Mehrfachmessungen.

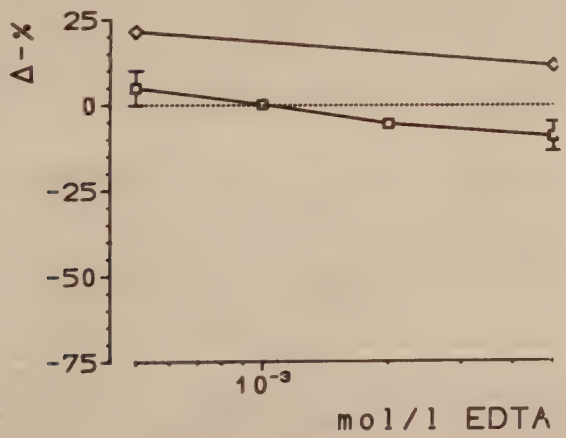


Abb.14

Einfluß von Na-Äthylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) auf die Empfindlichkeit von Erythrozyten gegen Scherkräfte. Die Verhinderung des "resealing" durch EDTA beeinflußt die Empfindlichkeit nicht entscheidend. Die Prozentwerte wurden aus angepaßten einfachen e-Funktionen unter Berücksichtigung einer eventuell durch EDTA induzierten Hämolyse errechnet. Untersucht wurden Erythrozyten von zwei Frischblutspendern bzw. aus einer ca. 3 Monate alten ACD-Konserve.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert ohne EDTA)
"□" = Frischblut "◇" = ACD-Konserve, ca 3 Monate alt

Wie verändert **Chlorpromazin** die mechanische Resistenz von Erythrozyten aus Frischblut und aus einer überalterten ACD-Konserve in **isotonem** Suspensionsmedium?

Die durch Chlorpromazin (CPZ) verursachte Erniedrigung der mechanischen Resistenz bei frisch gespendeten Erythrozyten ist für Konzentrationen ab 0.1 mmol/l statistisch hochsignifikant, während geringe stabilisierende Wirkungen im Bereich von 10 bis 30 µmol/l keine Signifikanz erreichten. Mit den Zellen aus der überalterten Konserve wurde bis zu 0.4 mmol/l CPZ keine vermehrte Hämoglobinfreisetzung gefunden, für höhere Konzentrationen liegen keine Messungen vor. Der Kurvenverlauf in Abb.15 deutet sogar auf eine Stabilisierung ab ca. 10 µmol/l hin, statistische Aussagen sind hier aber nicht möglich.

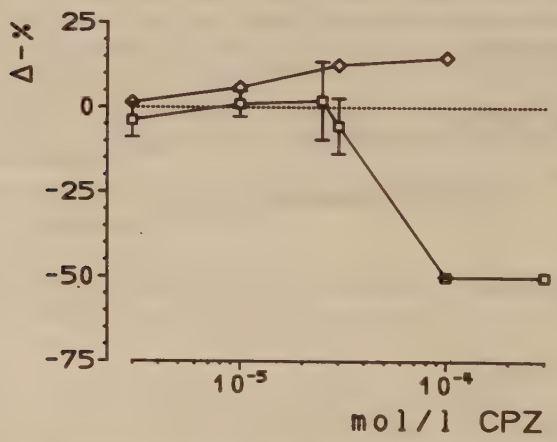


Abb.15

Einfluß von **Chlorpromazin** (CPZ) auf die Empfindlichkeit von Erythrozyten gegen Scherkräfte; Messung im **isotonen** Suspensionsmedium. Es konnte lediglich eine erhöhte Empfindlichkeit ab 30 µM bei Frischblut nachgewiesen werden. Die Prozentwerte wurden aus angepaßten einfachen e-Funktionen unter Berücksichtigung der pharmakoninduzierten Hämolyse errechnet. Untersucht wurden Erythrozyten von 4 Frischblutspendern bzw. aus einer ca. 3 Monate alten ACD-Konserve.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert ohne CPZ)
"□" = Frischblut "◇" = ACD-Konserve, ca 3 Monate alt

Die in Abb.15 mit "□" gekennzeichnete Frischblutkurve entstand durch Untersuchung von vier Individuen. Fallzahlen von N=2 pro Meßpunkt erklären sich dadurch, daß mit unterschiedlichen Verdünnungsreihen gearbeitet wurde (vgl. hierzu Kap. "Medianwert"). Kurve "◇" steht für die Zellen der verfallenen ACD-Konserve. Hier existiert allerdings nur eine einzelne Meßreihe. Bei jedem Individuum wurde für jede Konzentration mit variablem Druck gemessen, eine einfache e-Funktion angepaßt und wie beschrieben unter Korrektur der pharmakoninduzierten Hämolyse die Prozentwerte intrazellulären Hämoglobins errechnet. Danach erfolgte noch die Berechnung der Prozentverschiebung gegen die Kontrolle und Mittelung korrespondierender Werte.

Der Halbwertsdruck des wirkstofffreien Kontrollbluts betrug für die vier Frischblutmessungen 1011, 765, 716 und 427 mm Hg. Kurve "□" wurde mit dem Medianwertprogramm berechnet und weist im Bereich 10 bis 30 µmol/l einen geringen stabilisierenden Effekt von etwa 2% auf, der nicht signifikant gegen die Kontrolle ist (P-alpha=87%!). Ursache des hohen P-alpha können auch eine Verschiebung der Kurve nach unten aufgrund zu hohen Kontrollwerts (siehe Abb.15) oder die geringe Fallzahl sein. Eindeutig hingegen ist die destabilisierende Wirkung von Chlorpromazin auf Zellen aus Frischblut bei Konzentrationen ab 0.1 mmol/l (P-alpha≤0.1%). Da eine etwaige durch CPZ selbst bedingte Vorhämolyse rechnerisch eliminiert wurde, muß der Pharmakoneffekt in einer Herabsetzung der mechanischen Resistenz der Erythrozytenmembran bestehen.

Nach Kurve "◇" bleibt bei den Erythrozyten der etwa 3 Monate im Kühlschrank aufbewahrten ACD-Konserve der destabilisierende Effekt anscheinend aus, es ist sogar von 10 µmol/l bis 10 mmol/l Chlorpromazin ein stabilisierender Effekt von etwa 6% bis 15% zu beobachten. Die Aussagekraft wird aber einmal dadurch abgeschwächt, daß nur eine einzige Meßreihe vorliegt. Zum anderen ist zu bedenken, daß diese überalterte Zellpopulation bereits sehr empfindlich gegen mechanische Beanspruchung ist: Unbehandeltes Kontrollblut hatte einen Halbwertsdruck von nur 62 mm Hg (vgl. hierzu auch Abb.10). Möglicherweise ist die Sensibilität der empfindlicheren Zellen (oder der Methode) gegen eine weitere Destabilisierung unter solchen Bedingungen geringer.

Wie verändert **Chlorpromazin** die mechanische Resistenz von Erythroyzten aus Frischblut in **hypotonem** Suspensionsmedium?

Auch mit den im hypotonen Medium suspendierten Erythrozyten ließ sich eine Erhö[illegible] der mechanischen Fragilität nachweisen, hier bereits ab 50 µmol/l CPZ. Im Gegensatz zur isotonen Bedingung konnten jetzt aber auch stabilisierende Effekte bei geringeren Konzentrationen (5 bis 20 µmol/l) gefunden werden.

Die in Abb.16 gezeigten Kurven entstanden durch Verarbeitung von 4 Frischblutansätzen in 260 milliosmolarem Suspensionsmedium. Die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung erfolgte nach der direkten Methode bei einer konstanten Druckdifferenz von 150 mm Hg und mit 2 bis 6 Einzelmessungen pro Ansatz. Auswertung und graphische Darstellung entsprechen dem bisherigen Verfahren.

Eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Zellschädigung wurde mit den Chlorpromazin-Konzentrationen 5, 7, 10 und 20 µmol/l vorgefunden; die Prozentdifferenz war 1.6%, 2.4%, 3.2% und 3.8%. Bei der Prüfung auf statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ohne CPZ betrugen die entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeiten 2.6%, 1.8%, 12% und 17%. Leider besitzen die größten Differenzen zur Kontrolle (mit 10 und 20 µmol/l CPZ) wegen höherer Streuung die größte Irrtumswahrscheinlichkeit für Annahme eines Unterschieds.

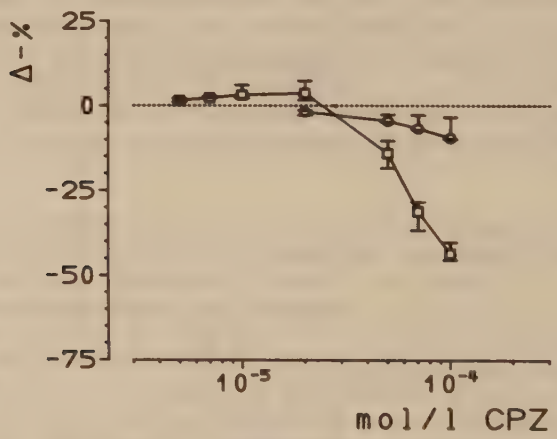


Abb.16

Einfluß von **Chlorpromazin** (CPZ) auf die Empfindlichkeit von **frisch gespendeten** Erythrozyten gegen Scherkräfte; Messung im **hypotonen** Suspensionsmedium (260 mOsm). Es werden geringe stabilisierende und deutliche destabilisierende Wirkungen auf die mechanische Fragilität sichtbar. Die Messungen wurden mit einer fest eingestellten Druckdifferenz von 150 mm Hg durchgeführt. Untersucht wurden Erythrozyten von 4 Spendern.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert ohne CPZ)
"□" = filtrierte Erythrozyten
"○" = Parallelmessung ohne Filterpassage

Abb.16 enthält außerdem noch eine mit "O" bezeichnete Kurve. Diese zeigt das Ergebnis der Parallelmessungen ohne Filterpassage und somit den Verlauf der durch das Pharmakon selbst induzierten Hämolyse. Solche Parallelbestimmungen fanden bei 3 von den 4 Ansätzen zu je 2 bis 4 Einzelmeßreihen statt. Die Proben wurden denselben Gefäßen entnommen, aus denen auch die Erythrozyten für die Filterpassage stammten. Solche "Blindreihen" sind nötig, da sich bei der direkten Methode die pharmakoninduzierte Hämolyse nicht rechnerisch eliminieren läßt und die gezeigten Messungen mit Filter überlagert.

Die Kurve "O" demonstriert mithin, daß chemisch induzierte Hämolyse den deutlichen destabilisierenden Effekt ab 50 µmol/l keineswegs allein verursacht, sondern nur geringfügig verstärkt. Chlorpromazin in höheren Konzentrationen vermindert somit unter den genannten Bedingungen zusätzlich zu seiner bekannten chemischen Membrandestabilisierung auch noch die mechanische Resistenz. Für Frischblut stimmen in diesem Konzentrationsbereich die Ergebnisse in isotonem und hypotonem Medium überein.

Da für die Parallelmessungen ohne Filterpassage kein zusätzlicher Kontrollwert für Hämolyse ohne Pharmakon bestimmt wurde, muß dieser gleich 100% gesetzt werden, um eine Prozentdifferenz angeben zu können. Dabei wird ein geringer Fehler in Kauf genommen. Die abgebildete "Blindwert-Kurve" wird also um etwa 5% (s. Methodik: Spontanhämolyse) zu tief liegen, was deren Aussagewert aber nicht beinträchtigt.

Wirkt **Chlorpromazin** auf die mechanische Resistenz **hypoton** suspendierter Erythrozyten einer frischen ACD-**Konserve** ähnlich wie bei frisch gespendeten?

Der Vergleich der Abbildungen 16 und 17 zeigt deutlich die geringere, aber im gleichen Konzentrationsbereich (ab 50 µmol/l) einsetzende Erniedrigung der mechanischen Resistenz der ACD-Erythrozyten. Kleine stabilisierende Effekte finden sich mit den gleichen Wirkstoffkonzentrationen wie bei Frischblut. Allerdings konnte für die Differenzen in beiden Richtungen nur ein deutlich schlechteres Signifikanzniveau erzielt werden.

Die mit "□" gekennzeichnete Kurve in Abb.17 ergab sich durch Verarbeitung von zwei Ansätzen in 260 milliosmolarem Suspensionsmedium bei 2 bis 6 Messungen pro Ansatz. Bei diesen Versuchen wurde mit variabler Wirkstoffkonzentration und einem fixen Druckgradienten von 150 mm Hg gemessen (direkte Methode). Das Vorgehen bei der Versuchauswertung und bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse entspricht dem bei der Frischblutverarbeitung (s.o.).

Die mit "O" bezeichnete Kurve beschreibt das Ergebnis der Parallelmessungen ohne Filterpassage und zeigt, daß der destabilisierende Effekt im wesentlichen durch Erniedrigung der mechanischen Resistenz und nicht durch pharmakoninduzierte Hämolyse verursacht ist.

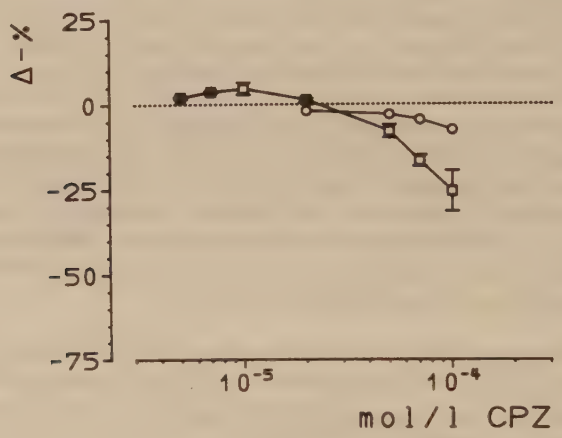


Abb.17

Einfluß von **Chlorpromazin** (CPZ) auf die Empfindlichkeit von Erythrozyten aus einer frischen ACD-**Konserve** gegen Scherkräfte; Messung im **hypotonen** Suspensionsmedium (260 mOsm). Es zeigen sich geringe stabilisierende und größere destabilisierende Wirkungen auf die mechanische Fragilität. Die Messungen wurden mit einer fest eingestellten Druckdifferenz von 150 mm Hg an Erythrozyten derselben Konserve wiederholt durchgeführt.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert ohne CPZ)
"□" = filtrierte Erythrozyten
"O" = Parallelmessung ohne Filterpassage

Die Stabilisierung war bei den Erythrozyten aus der frischen ACD-Konserve (Abb.17) etwas größer als bei denen der Frischblutspender (Abb.16), das Signifikanzniveau jedoch deutlich schlechter; vgl. hierzu die Tabellen im Anhang. Eine Ausnahme bildet das Ergebnis mit 7 µmol/l CPZ: dessen Unterschied zur Kontrolle hat eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 3.8%; das höhere P-alpha von 12% bis 24% bei den benachbarten Konzentrationen läßt aber an eine falsch positive Aussage denken.

Die Daten mit destabilisierenden Wirkstoffkonzentrationen verfehlen zwar das 5%-Signifikanzniveau; aufgrund der eindeutigen Tendenz der beiden Kurven kann aber dennoch behauptet werden, daß Chlorpromazin ab 50 µmol/l die mechanische Resistenz auch bei Erythrozyten aus der ACD-Konserve vermindert.

Verändert **Chlorpromazin-Methojodid** die mechanische Resistenz von Erythrozyten aus Frischblut und aus einer frischen ACD-Konserve in **hypotonem** Suspensionsmedium?

Bei Untersuchung von Frisch- und ACD-Konservenblut in hypotonem Suspensionsmedium konnte kein Einfluß von Chlorpromazin-Methojodid auf die mechanische Resistenz von Erythrozyten gefunden werden. Abb.18 zeigt den ausbleibenden Effekt dieses kationischen Wirkstoffs. Die mit "□" gekennzeichnete Kurve entstand durch Verarbeitung eines Frischblutansatzes in 260 milliosmolarem Suspensionsmedium mit 2 Meßreihen, woraus der Mittelwert der korrespondierenden Punkte aufgetragen wurde. Die Kurve "◇" ergibt sich entsprechend durch Verarbeitung eines Ansatzes aus Konservenblut mit 4 Meßreihen.

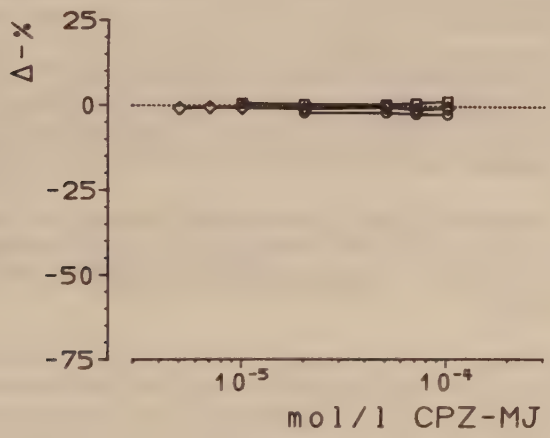


Abb.18

Kein Einfluß von **Chlorpromazin-Methojodid** (CPZ-MJ) auf die Empfindlichkeit von Erythrozyten gegen Scherkräfte. Die Messungen wurden mit einer fest eingestellten Druckdifferenz von 150 mm Hg durchgeführt. Die Erythrozyten wurden frisch gespendet bzw. einer ACD-Konserve entnommen und in hypotonem Suspensionsmedium (260 mOsm) untersucht.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert ohne CPZ-MJ)
"□" = Frischblut - filtrierte Erythrozyten
"◇" = ACD-Konserve - filtrierte Erythrozyten
"○" = ACD-Konserve - Parallelmessung ohne Filterpassage

Die Messung erfolgte mit variabler Wirkstoffkonzentration bei einem fest eingestellten Druckgradienten von 150 mm Hg. Berechnung der Prozentverschiebung gegen die Kontrolle und Mittelung der Einzelmessungen wurden ebenso wie die graphische Auftragung wie bisher durchgeführt. Die mit "O" bezeichnete Kurve zeigt das Ergebnis der Parallelmessungen ohne Filterpassage, die mit Erythrozyten aus Konservenblut durchgeführt wurden. Für Frischblut liegt keine Parallelmessung vor.

Wie verändert **Natrium-dodecylsulfat** die mechanische Resistenz von Erythrozyten aus einer frischen ACD-Konserve in **hypotonem** Suspensionsmedium?

Abb.19 zeigt die ab einer Konzentration von 50 µmol/l eintretende Destabilisierung der untersuchten hypoton suspendierten Erythrozytenpopulation. Der Effekt beruht nicht auf erniedrigter mechanischer Resistenz, sondern resultiert aus pharmakoninduzierter Vorhämolyse. Die gezeigten Kurven ergaben sich durch Untersuchung von Erythrozyten einer frischen ACD-Konserve in 260 milliosmolarem Suspensionsmedium. Es wurden je 2 SDSVerdünnungsreihen angesetzt und die Hämoglobinfreigabe mit und ohne Filterpassage gemessen.

Der Versuch erfolgte mit variabler Wirkstoffkonzentration bei einem Druckgradienten von 150 mm Hg. Für die Berechnung der Prozentverschiebung gegen die Kontrolle, Mittelung der Einzelmessungen und graphische Auftragung gilt das bisher Gesagte.

Die Parallelmessung ohne Filterpassage zeigt in Beginn und Steilheit der destabilisierenden Wirkung gleiches Verhalten wie die "Filterkurve". Die Werte der Parallelmessung dürften theoretisch nicht unterhalb der "Filterwerte" liegen. Es sei aber nochmals daran erinnert, daß für diese Parallelreihe kein Kontrollwert ohne Pharmakon existiert und deswegen ersatzweise die Differenz zu 100% intrazellulärem Hämoglobin als Näherung dargestellt wird. Wegen der Spontanhämolyse liegt diese Kurve etwas zu niedrig.

Die geringe stabilisierende Wirkung liegt in der gleichen Größenordnung (kleiner 5%) wie bei Chlorpromazin. Da hier aber nur eine Population untersucht wurde, ist eine statistische Aussage für Effekte in beiden Richtungen nicht möglich.

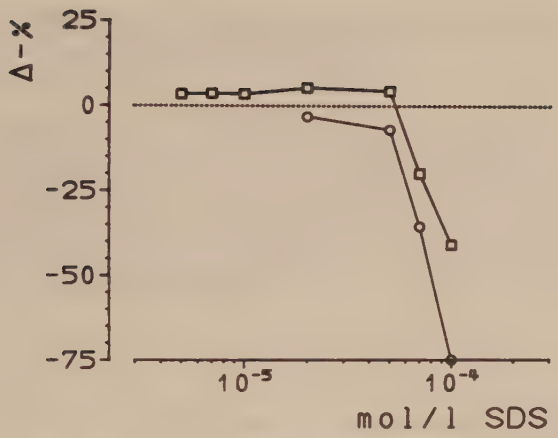


Abb.19

Kein nachweisbarer Einfluß von **Na-dodecylsulfat** (SDS) auf die Empfindlichkeit von Erythrozyten gegen Scherkräfte. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt mit und ohne Filtration gleichen Verlauf. Die Messungen wurden mit einer fest eingestellten Druckdifferenz von 150 mm Hg in hypotonem Suspensionsmedium (260 mOsm) an Erythrozyten einer frischen ACD-Konserve wiederholt durchgeführt.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins (Meßwert minus Kontrollwert ohne SDS)
"□" = filtrierte Erythrozyten
"o" = Parallelmessung ohne Filterpassage

Verändert **Na-Thiopental** die mechanische Resistenz von Erythrozyten aus einer frischen ACD-Konserve in **hypotonem** Suspensionsmedium?

Abb.20 zeigt einen geringen stabilisierenden Effekt von Na-Thiopental (unter 10%) auf die mechanische Resistenz der untersuchten hypoton suspendierten ACD-Erythrozyten. Die mit "□" gekennzeichnete Kurve entstand durch Messung mit einer Zellpopulation aus ACD-Konservenblut in 260 milliosmolarem Suspensionsmedium. Es erfolgten 5 Versuchsreihen mit einem fixen Druckgradienten von 150 mm Hg; Auswertung und graphische Darstellung geschahen wie bisher. Kontrollreihen ohne Filterpassage mit variabler Wirkstoffkonzentration fanden diesmal nicht statt.

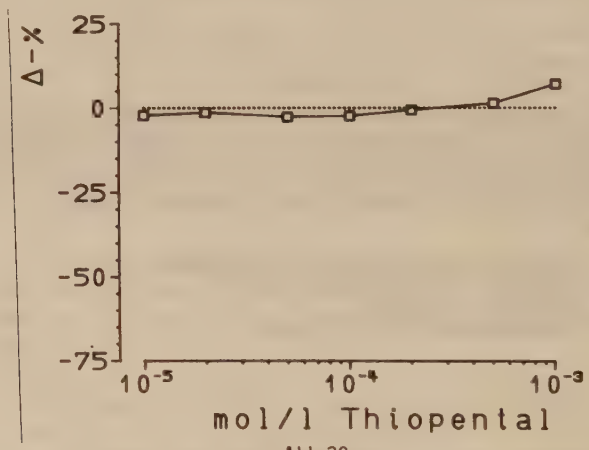


Abb.20

Einfluß von **Thiopental-Natrium** auf die Empfindlichkeit von Erythrozyten gegen Scherkräfte. Eine geringe stabilisierende Wirkung dieses Barbitursäurederivats wird ab 1 mmol/l sichtbar. Die Messungen wurden mit einer fest eingestellten Druckdifferenz von 150 mm Hg in hypotonem Suspensionsmedium (260 mOsm) durchgeführt. Untersucht wurden Erythrozyten einer frischen ACD-Konserve in wiederholter Versuchsdurchführung.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins
(Meßwert minus Kontrollwert ohne Thiopental)

Verändert **Thiazinamium** die mechanische Resistenz von frisch gespendeten Erythrozyten in **hypotonem** Suspensionsmedium?

Thiazinamium hat offensichtlich keinen Einfluß auf die mechanische Fragilität der hier untersuchten Erythrozyten. Die Hämoglobinfreisetzung nimmt mit etwa gleichem Beginn bei 5 bis 10 mmol/l und gleicher Steilheit zu, wie dies bei der Parallelmessung ohne Filterpassage registriert wurde. Dies spricht für eine chemisch induzierte Hämolyse, eine mechanische Resistenzabnahme kann somit nicht festgestellt werden.

Für die Kurven in Abb.21 wurden frisch gespendete Erythrozyten in 260 milliosmolarem Suspensionsmedium untersucht. Es erfolgten 2 Meßreihen mit variabler Wirkstoffkonzentration bei einem fixen Druckgradienten von 150 mm Hg; zusätzlich wurde eine Parallelmessung ohne Filterpassage durchgeführt. Die Auswertung gleicht dem bereits beschriebenen Vorgehen.

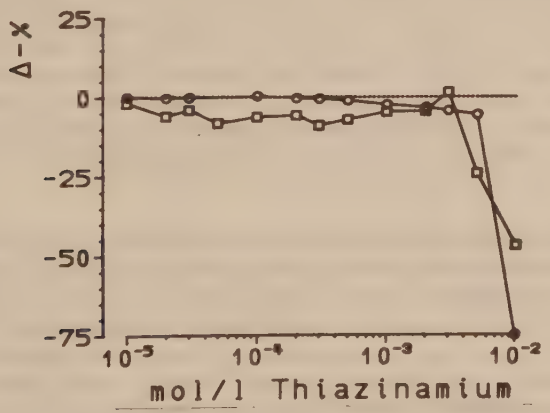


Abb.21

Einfluß von Thiazinamium auf die Empfindlichkeit von Erythrozyten gegen Scherkräfte. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt mit filtrierten Erythrozyten wie bei der Parallelmessung ohne Filterpassage nahezu gleichen Verlauf. Die Messungen wurden mit einer fest eingestellten Druckdifferenz von 150 mm Hg in hypotonem Suspensionsmedium (260 mOsm) an frisch gespendeten Erythrozyten wiederholt durchgeführt.

"Δ%" = Prozentdifferenz intrazellulären Hämoglobins
(Meßwert minus Kontrollwert ohne Thiazinamium)
"□" = filtrierte Erythrozyten
"○" = Parallelmessung ohne Filterpassage

VERSUCHSAUFBAU DER DESORPTIONSMETHODE

Mit der Desorptionsmethode wurde die Fähigkeit von Erythrozyten untersucht, enge Poren in Abhängigkeit von ihrem osmotischen Schwellungszustand zu passieren. Das Vorgehen besteht in einer gering modifizierten "Hygroskopischen Desorptionsmethode", die von Conrad et al. (19, 20) und Bondy et al. (6) beschrieben wurde. Versuchsziel war es festzustellen, inwieweit sich die Passagefähigkeit unter Einfluß von Chlorpromazin, Thiazinamium und Albumin ändert.

Versuchsanordnung

Bei der Prüfung des Durchtrittsvermögens der Erythrozyten fanden die gleichen Polycarbonat-Filter Verwendung wie bei den Versuchen mit Überdruck; für die Materialbeschreibung wird dorthin verwiesen. Auf den Filter aufgebrachte Erythrozytensuspension mußte so nach unten abgesaugt werden, daß eine nicht passagefähige Zellfraktion auf der Filteroberfläche verblieb. Die abgezogene Lösung mitsamt den zum Porendurchtritt fähigen Erythrozyten wurde dabei von einem Zellulosefilz (Fa. Whatman Ltd., England) aufgrund seiner Kapillarwirkung aufgenommen. Um möglichst gleichbleibenden Kapillar-Sog zu erhalten, wurde regelmäßig für jede Probe ein Teil der Zellulosescheibchen ausgewechselt.

Der entstehende Sog wäre groß genug gewesen, um diejenigen Zellen platzen zu lassen, die zur Porenpassage nicht genügend verformbar waren. Ein "Zwischenfilter", bestehend aus einem Monofilament-Nylonnetz (Fa. Eckert Seidengazefabrik, Zürich; ASTM 140-105) sorgte daher für Verminderung der Saugwirkung. Polycarbonatfilter, Zwischenfilter und mehrere Filzscheibchen waren in dieser Reihenfolge von oben nach unten in einem Schraubgefäß fest eingespannt. Die Oberseite war zum Aufpipettieren der Suspensionen frei zugänglich.

Ausführung

Die Herstellung einer Suspension mit Hämatokrit 2% erfolgte wie bereits beschrieben aus dreimal in PBS gewaschenen Erythrozyten, Medium war ebenfalls PBS. Bei allen Desorptionsversuchen wurde frisch entnommenes Venenblut verschiedener Spender verarbeitet. Die Proben wurden nach Einstellen der gewünschten Osmolarität (siehe unten) auf Eppendorf-Cups zu je 1 ml verteilt, wo dann auch eventuelle Inkubation mit einem Pharmakon stattfand.

Aus jedem Probengefäß wurden 100 µl auf die Filteroberfläche pipettiert und die Desorption der Flüssigkeit abgewartet. Daraufhin wurde der Filter aus dem Schraubgefäß entnommen und in 1 ml Wasser gewaschen. Das Hämoglobin der vom Filter zurückgehaltenen Erythrozyten konnte dann photometrisch gemessen werden.

Um den 100%-Standard zu bestimmen, wurden für jeden Meßpunkt gleichzeitig mit den Proben 100 µl Suspension aus demselben Gefäß in 1 ml Wasser pipettiert. Das Meßvolumen des Standards betrug daher 1.1 ml, wogegen das Probenvolumen durch das Einwaschen von Erythrozyten vernachlässigbar wenig zunahm. Bei der Prozentrechnung wurde die Volumendifferenz zwischen Standard und Probe berücksichtigt, siehe unten.

Osmotische Verdünnungsreihe

Die Anfertigung einer Verdünnungsreihe mit stufenweise erniedrigter Osmolarität geschah durch Erweitern des jeweils erforderlichen Zellsuspensionsvolumens (Hk=2) mit Wasser auf 1 ml, wobei gilt:

$$Vs = Op / 0.9$$

Vs = erforderliches Volumen Suspension;
Op = gewünschte Osmolarität des Probenmediums, in % der NaCl-Konzentration angegeben.

Dementsprechend erniedrigte sich auch der Hämatokritwert, z.B. auf Hk=1% bei 0.45% NaCl. Die Bestimmungen wurden nacheinander mit fallender Osmolarität durchgeführt, um einer Kontamination der nachfolgenden Probe durch Hämoglobin vorzubeugen.

Vor jeder Messung wurden Filter und Zwischenfilter in 15-prozentiger Isopropanol-Lösung gewaschen, dann im Schraubgefäß eingespannt und das restliche Isopropanol mit 100 µl Wasser vom Filter entfernt. Da die Filter eine glatte und eine weniger glatte Oberfläche aufwiesen und über etwaige Einflüsse dieses Umstands nichts bekannt war, wurden sie jedesmal mit der glatten Seite nach oben eingelegt.

Berechnung Prozent Erythrozyten auf Filter

Das freigesetzte Hämoglobin wurde nach Zentrifugation auf gleiche Weise wie bei den anderen Methoden photometrisch bestimmt. Der Prozentsatz derjenigen Erythrozyten, die aufgrund ihrer Volumenzunahme im hypotonen Medium die Filterporen nicht passieren konnten, ergibt sich aus der Gleichung

$$Y = 100 * V * E/H.$$

Y = % zurückgehaltene Erythrozyten
V = Volumenkorrekturfaktor
(=Vol. Probe / Vol. Standard; siehe oben).
E = Extinktion 1 ml Filterwaschwasser
H = Extinktion 100 µl Suspension + 1 ml Wasser

Der so berechnete Prozentsatz nicht permeierender Zellen wurde gegen die NaCl-Konzentration graphisch aufgetragen.

Osmotische Hämolyse zur Kontrolle

Als Plausibilitätskontrolle erfolgte bei einem Teil der Versuche die Bestimmung der osmotischen Hämolyse parallel zu den Filterversuchen. Aus denselben Probengefäßen wurden 100 µl der hypotonen Suspension anstatt auf den Filter in 1 ml PBS pipettiert, für den 100%-Standard in 1 ml Wasser. Für die Berechnung des Anteils intrazellulären Hämoglobins in Prozent gilt:

$$Y = 100 * (1-E/H).$$

Y = % intrazelluläres Hämoglobin
E = Extinktion 100 µl Suspension + 1 ml PBS
H = Extinktion 100 µl Suspension + 1 ml Wasser

Diese Prozentwerte können zum Vergleich in dasselbe Koordinatensystem eingetragen werden wie die Prozente zurückgehaltener Erythrozyten. Letztgenannter Parameter muß gleichzeitig mit dem Einsetzen der osmotischen Hämolyse abfallen, weil dann freigesetztes Hämoglobin und Erythrozytenreste passagefähig sind. Abb.22 zeigt als Beispiel den fast deckungsgleichen Verlauf der beiden Parameter ab 0.46 g% NaCl.

Osmot. Reihe mit einer festen Wirkstoffkonzentration

Die osmotischen Reihen wurden mit einem Teil der NaCl-Konzentrationen nochmals ausgeführt, nachdem die Proben mit einer bestimmten Konzentration eines Pharmakons inkubiert worden waren:

Chlorpromazin	$2*10^{-5}$ mol/l
Thiazinamium	10^{-3} mol/l
Albumin	2 mg/ml

Die Konzentrationen wurden wie üblich eingestellt, indem zu 1 ml Probe 10 µl einer Wirkstofflösung mit 100-facher Nennkonzentration hinzupipettiert wurden. Kontrollen ohne Pharmakon erhielten das gleiche Volumen Wasser. Die Berechnung des Prozentsatzes nicht permeierender Erythrozyten und die Eintragung in das Koordinatensystem (Prozent Zellen auf Filter gegen Prozent NaCl) erfolgte wie bei den anderen osmotischen Reihen.

Dosis-Wirkungs-Kurven

Für die Dosis-Wirkungs-Kurven wurde eine NaCl-Konzentration gewählt, bei der voraussichtlich 50% der Erythrozyten aufgrund ihrer osmotischen Schwellung die Filterporen nicht passieren können und daher auf der Filteroberfläche verbleiben. Dieser Wert wurde für jeden Spender neu bestimmt. Er lag immer zwischen 0.45 g% und 0.5 g% NaCl.

Eine solche hypotone Erythrozyten-Suspension wurde auf Eppendorf-Cups zu je 1 ml verteilt und anschließend Pharmakonlösung hinzupipettiert. Der Desorptionsversuch erfolgte nach mindestens 7 min Inkubationszeit.

ERGEBNISSE DER DESORPTIONSMETHODE

Wie beeinflußt die **Osmolarität** des Suspensionsmediums die Passagefähigkeit von Erythrozyten durch enge Filterporen?

Im Gegensatz zu den Versuchen nach der Scherkraftmethode, wo die Erythrozyten mit Hilfe genügend starken Überdrucks durch den Filterkanal gepreßt wurden, war die treibende Kraft bei der Desorptionsmethode deutlich geringer. Es konnten daher nur genügend verformbare Erythrozyten den 3µ dicken Kanal passieren; der Rest verblieb auf der Filteroberfläche.

In Abb.22 zeigt die mit "□" gekennzeichnete Kurve den Anteil der nicht passagefähigen Zellen in Abhängigkeit von der Osmolarität des Suspensionsmediums. Unter isotonen Verhältnissen können Erythrozyten die Filterkanäle ohne weiteres durchfließen. Mit abnehmender NaCl-Konzentration wird aufgrund osmotisch bedingter Volumenzunahme die Passage immer mehr behindert und ein größerer Teil der Erythrozyten verbleibt auf der Filteroberfläche. Mit Einsetzen der osmotischen Hämolyse bei etwa 0.46 g% NaCl fällt die Kurve wieder ab, weil die geplatzten Zellen durchgespült und daher nicht mehr auf dem Filter nachgewiesen werden.

Eine weitere, mit "O" gekennzeichnete Kurve stellt den Verlauf der parallel mitgemessenen osmotischen Hämolyse dar. Sie demonstriert zur Plausibilitätskontrolle, daß osmotische Hämolyse und Abnahme der auf dem Filter verbleibenden Zellen gleichen Beginn und gleiche Steilheit aufweisen; die beiden Kurven sind unterhalb 0.46 g% NaCl gleichlaufend. Bis 0.46 g% NaCl bleiben daher aufgrund osmotischer Volumenzunahme immer mehr Zellen auf der Filteroberfläche. Unterhalb dieser Marke wird weniger Hämoglobin auf dem Filter nachgewiesen, weil es aus den Erythrozyten freigesetzt wird und somit die Filterporen passieren kann.

Die Daten der Abb.22 kamen durch Mittelung der Ergebnisse von 4 verschiedenen Erythrozytenpopulationen zustande. Die Symbole bezeichnen die Medianwerte; die zugehörigen Quantile p=0.25 und p=0.75 sind markiert.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Einfluß verschiedener Pharmaka auf die Größe der auf der Filteroberfläche zurückgehaltenen Erythrozytenfraktion. Auf der Ordinate ist nicht mehr der Prozentanteil dieser Fraktion selbst, sondern die Prozentdifferenz zur Kontrolle ohne Wirkstoff dargestellt. Solche Kontrollmessungen wurden mit den gleichen Stammsuspensionen parallel zur Messung mit Pharmakon durchgeführt.

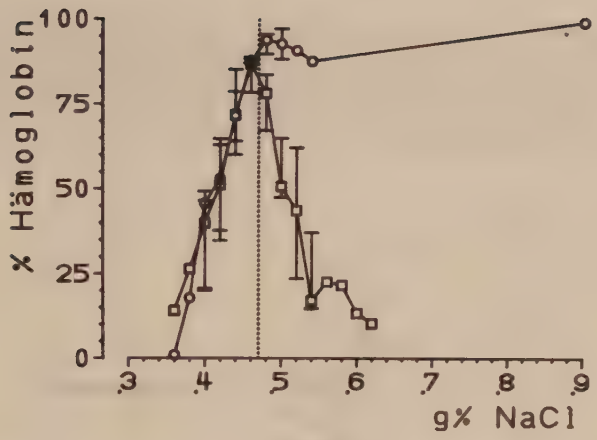


Abb.22

Einfluß der Osmolarität des Suspensionsmediums auf die Passagefähigkeit von Erythrozyten durch 3µ dicke Filterporen. Mit abnehmender NaCl-Konzentration werden zunehmend Zellen zurückgehalten; ab 0.46 g% NaCl setzt osmotische Hämolyse ein, Zellinhalt und Membranen können den Filter passieren. Die Abbildung zeigt Medianwerte aus 4 Desorptionsreihen und 4 osmotischen Hämolysereihen, beide ohne Pharmakonzusatz. Horizontale Markierungen begrenzen den 50%-Interquantilsbereich.

"□" = Prozent retinierte Erythrozyten (% Hb auf Filter)
"○" = osmotische Hämolyse (% intrazelluläres Hb)

Wie verändert **Chlorpromazin** die Passagefähigkeit der Erythrozyten?

Die bekannte osmotische Stabilisierung durch eine Chlorpromazinkonzentration von etwa 20 µmol/l läßt erwarten, daß mit einer NaCl-Verdünnung, die einer halbmaximalen osmotischen Hämolyse entspricht, mehr intakte (aber nicht passagefähige!) Zellen auf der Filteroberfläche verbleiben als ohne CPZ. Der nach hypoton abfallende Teil der "Filterkurve" in Abb.22 geht mit der Hämolysekurve mit. Ein antihämolytischer Pharmakoneffekt muß diesen Kurventeil zusammen mit der Hämolysekurve nach hypoton verschieben, so daß in diesem Bereich eine positive Prozentdifferenz zur Kontrolle entsteht.

Abb.23 zeigt bei drei von vier Messungen tatsächlich bei 0.45 g% NaCl eine Vergrößerung der auf der Oberfläche zurückgehaltenen Fraktion im Vergleich zur Kontrolle ohne Chlorpromazin. Die Differenz beträgt bei den drei Versuchen mit 20 µmol/l CPZ 15%, 37% bzw. 43% (Kurve "○", "△" bzw. "□"); das Signifikanzniveau liegt bei 6.5%. Bei noch geringerer Osmolarität wird ein

Rückgang dieses Effekts erwartet, weil CPZ die osmotische Hämolyse nicht mehr auffangen kann. In Richtung auf isotone Verhältnisse werden die Zellen wieder ein eher normales Volumen erhalten und können mit oder ohne CPZ gleichermaßen durch den Filterkanal treten, die Kurve in Abb.23 nähert sich infolgedessen wieder der Nullinie.

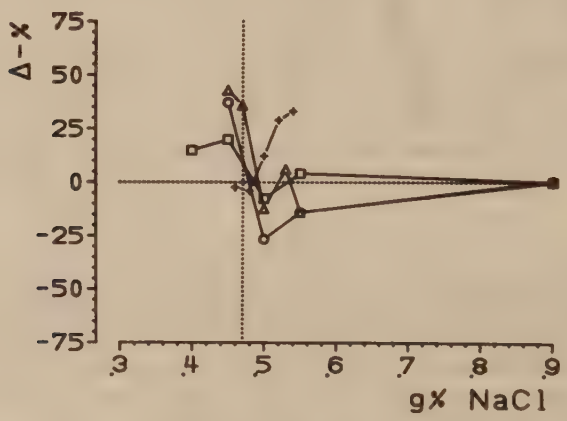


Abb.23

Einfluß von **Chlorpromazin** (CPZ) auf die Passagefähigkeit von Erythrozyten durch die Filterporen. Bei 3 von 4 Versuchen verbesserte CPZ die Verformbarkeit in 0.5 g% NaCl. Sonst zeigt sich eher eine verminderte Passagefähigkeit. Die Meßwerte wurden mit einer antihämolytischen CPZ-Konzentration ermittelt. Ohne CPZ liegt das Maximum der Zellretention bei 0.47 g% NaCl (vertikale gestrichelte Linie).

"Δ%" = Prozentdifferenz retinierter Erythrozyten (Meßwert minus Kontrollwert ohne CPZ)
"O", "Δ", "□" = Chlorpromazin $2.0*10^{-5}$ mol/l
"+" = Chlorpromazin $2.5*10^{-5}$ mol/l

Bei den drei genannten Beobachtungen mit einer fixen CPZ-Konzentration von 20 μmol/l haben sich Zunahmen der permeablen Fraktionen gezeigt, wenn das Suspensionsmedium 0.5 g% NaCl enthält. Mit dieser NaCl-Konzentration findet praktisch keine osmotische Hämolyse statt. Der Medianwert der Differenzen beträgt etwa 12% (vgl. Tabelle zu Abb.23 im Anhang). Der Unterschied zur Kontrolle besitzt aber nur ein geringes Signifikanzniveau (P-alpha etwa 27%, geringe Fallzahl!).

Bei einem weiteren Versuch, diesmal mit 25 mikromolarer Chlorpromazinkonzentration (in Abb.23 mit "+" gekennzeichnet), war eine solche Erhöhung der Passagefähigkeit nicht zu beobachten; es verblieben sogar mit NaCl-Konzen-

trationen zwischen 0.5 g% und 0.54 g% deutlich mehr Erythrozyten auf der Filteroberfläche (bis über 30%). Abb.24 zeigt diese Messung nochmals mit den Originalprozenten des zurückgehaltenen Anteils. Der nach hypoton ansteigende Teil der "Filterkurve" wird durch CPZ nach isoton verschoben; die Passagebehinderung setzt mit Pharmakon also schon bei geringerer NaCl-Verdünnung ein.

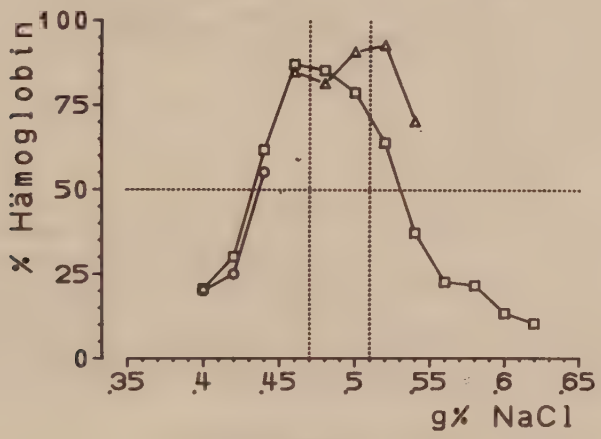


Abb.24

Einfluß von **Chlorpromazin** (CPZ) auf die Passagefähigkeit von Erythrozyten durch die Filterporen. CPZ bewirkt eine Retention der Zellen schon bei geringerer osmotischer Schwellung. Die Maxima der Retention liegen bei 0.47 g% NaCl ohne CPZ und 0.51 g% NaCl unter Einfluß einer antihämolytischen CPZ-Konzentration.

"□" = Prozent retinierte Erythrozyten (% Hb auf Filter) ohne CPZ
"△" = dto. mit Chlorpromazin $2.5*10^{-5}$ mol/l
"○" = osmotische Hämolyse (% intrazelluläres Hb)

Die Resultate weiterer Untersuchungen, diesmal mit variabler CPZ-Konzentration, sind in Abb.25 dargestellt. Die mit "○" bezeichnete Kurve beschreibt den Anteil nicht permeabler Erythrozyten einer Suspension mit 0.46 g% NaCl. Bei dieser Kochsalzverdünnung setzt gerade osmotische Hämolyse ein. Die anderen beiden Messungen wurden mit 0.5 g% NaCl ausgeführt. Mit 40 mikromolarer Chlorpromazinlösung ist bei beiden Kurven ein deutlicher Anstieg der auf dem Filter zurückgehaltenen Fraktion zu verzeichnen. Angesichts der durch diese Wirkstoffkonzentration verursachten Formveränderung des Erythrozyten (vgl. Diskussion) erscheint dies plausibel. Eine Verbesserung der Passagefähigkeit läßt sich mit 0.5 g% NaCl bei keiner Chlorpromazinkonzentration erkennen, die Daten sprechen eher für Passagebehinderung. Mit 0.46 g% NaCl beträgt die geringe Förderung der Passage nicht mehr als 5% und liegt somit im Bereich des Versuchsfehlers.

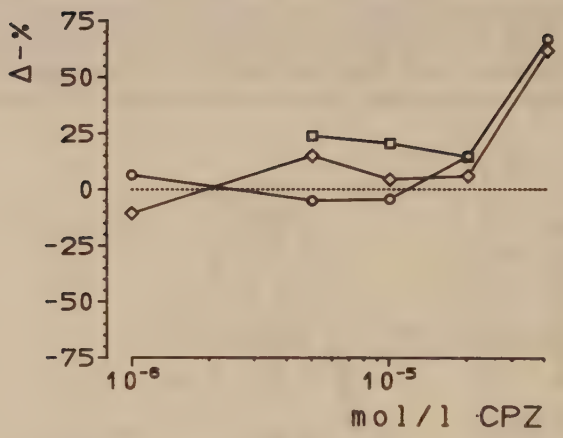


Abb.25

Einfluß von **Chlorpromazin** (CPZ) auf die Passagefähigkeit von Erythrozyten durch die Filterporen. Es findet sich in 0.5 g% NaCl kein eindeutiger Hinweis auf eine verbesserte Verformbarkeit. In 0.46 g% NaCl setzt gerade osmotische Hämolyse ein (s. Text und Abb.22).

"Δ%" = Prozentdifferenz retinierter Erythrozyten (Meßwert minus Kontrollwert ohne CPZ)
"□", "◇" = Chlorpromazin in 0.50 g% NaCl
"○" = Chlorpromazin in 0.46 g% NaCl

Wie verändert **Thiazinamium** die Passagefähigkeit der Erythrozyten?

Thiazinamium in 1 millimolarer Konzentration verbesserte das Passageverhalten in 0.5- bis 0.48-prozentiger Kochsalzlösung. Der Effekt beträgt zwischen 25% und 50% gegenüber der Kontrolle ohne Wirkstoff (Abb.26). Mit variabler Thiazinamiumkonzentration in 0.5 g% NaCl sind die Effekte nicht eindeutig erkennbar (Abb.27). Bei zwei von drei Populationen zeigte sich immerhin mit $5*10^{-3}$ M Thiazinamium eine vergrößerte Passagefähigkeit von etwa 25% bis 30%. Das quarternäre Phenothiazin wurde mit dem gleichen Vorgehen untersucht wie Chlorpromazin.

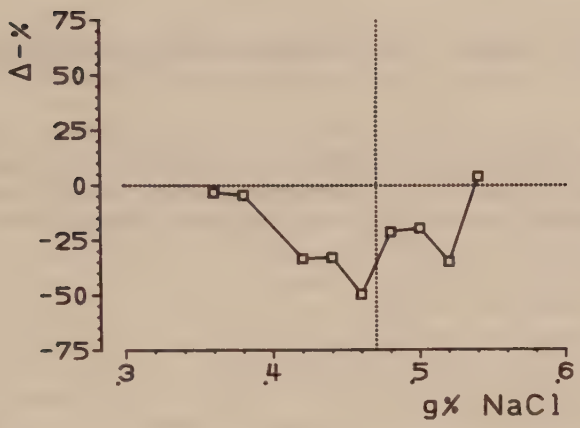


Abb.26

Thiazinamium verbesserte in einem Versuch die Passagefähigkeit von Erythrozyten durch die Filterporen. Die Meßwerte wurden mit einer antihämolytischen Thiazinamium-Konzentration von 1 millimol/l ermittelt. Das Maximum der Retention ohne Thiazinamium liegt bei 0.47 g% NaCl (vertikale gestrichelte Linie).

"Δ%" = Prozentdifferenz retinierter Erythrozyten
(Meßwert minus Kontrollwert ohne Thiazinamium)

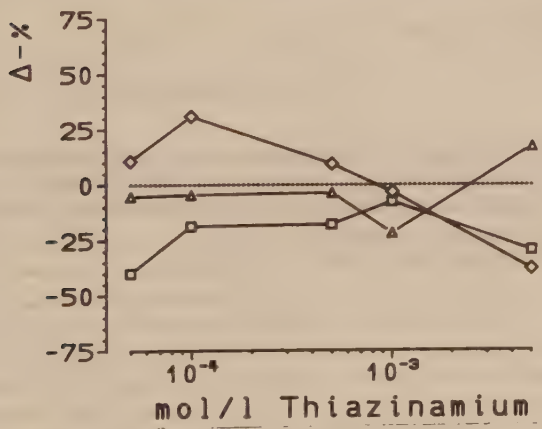


Abb.27

Einfluß von **Thiazinamium** auf die Passagefähigkeit von Erythrozyten durch die Filterporen. Eine verbesserte Verformbarkeit ist hier nicht eindeutig erkennbar. Die drei Erythrozytenpopulationen wurden in 0.5 g% NaCl untersucht.

"Δ%" = Prozentdifferenz retinierter Erythrozyten
(Meßwert minus Kontrollwert ohne Thiazinamium)

Wie verändert **Albumin** die Passagefähigkeit der Erythrozyten?

Die Untersuchung einer albuminhaltigen Erythrozytensuspension erbrachte verminderte Passagefähigkeit. Die Differenz zur Kontrolle ohne Albumin beträgt bis zu 21% (Abb.28). Die Albuminkonzentration war für alle NaCl-Verdünnungsstufen 2 mg/ml. Arbeitsweise und Auswertung entsprechen dem bisher Gesagten.

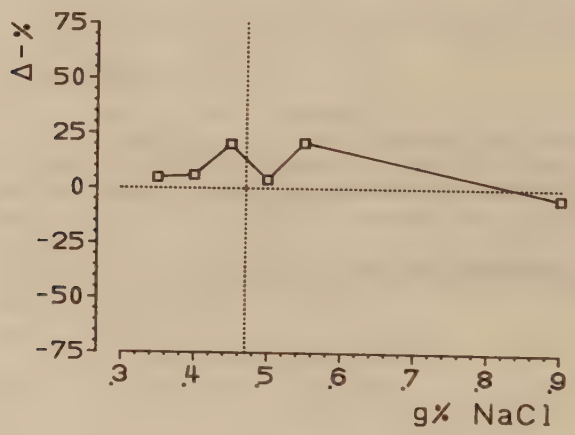


Abb.28

Albumin vermindert die Passagefähigkeit von Erythrozyten durch die Filterporen. Die Meßwerte wurden mit 2 mg/ml Albumin ermittelt. Das Maximum der Retention ohne Albumin liegt bei 0.47 g% NaCl (vertikale gestrichelte Linie).

"Δ%" = Prozentdifferenz retinierter Erythrozyten
(Meßwert minus Kontrollwert ohne Albumin)

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Der antihämolytische Effekt von Phenothiazinen ist seit langem bekannt (54, 61-66) und wird von einigen Autoren (61-66) auf eine membranexpandierende Wirkung zurückgeführt, die das Oberflächen-Volumen-Verhältnis beim Erythrozyten vergrößert. Erstaunlich ist aber die Tatsache, daß auch quarternäre Phenothiazine wie Chlorpromazin-Methojodid und Thiazinamium gegen osmotische Hämolyse stabilisieren (54), obwohl diese Substanzen eine obligate positive Ladung tragen und daher in die Lipidphase biologischer Membranen kaum eindiffundieren können. Der vorliegenden Arbeit liegt die Idee zugrunde, daß der stabilisierende Effekt weniger von einer primären Diffusion von Wirkstoffmolekülen in die Membran abhängt, sondern vielmehr eine mechanische Vorbelastung voraussetzt. Um zwischen den genannten Möglichkeiten zu entscheiden, wurden mit der Ultraschall- und der Scherkraftmethode kurzfristige mechanische Belastungen gesetzt und mit der Desorptionsmethode die Verformbarkeit von Erythrozyten unter geringen, aber länger anhaltenden Kräften geprüft. Der Einfluß der benutzten anionischen, kationischen und nichtionischen Pharmaka auf die Größen Hämoglobinfreisetzung (Ultraschall- und Scherkraftmethode) und Verformbarkeit (Desorptionsmethode) wird im folgenden diskutiert.

Hämolyse durch Ultraschall

Die Hämoglobinfreigabe durch Ultraschall war von der Schallintensität und von der Beschallungsdauer abhängig. Es konnte eine einfach-exponentielle Abhängigkeit von der Beschallungszeit nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus der Zellzerstörung ist nicht vollständig klar. Die größte Bedeutung haben wahrscheinlich Kavitationen. Diese bilden sich ab einer Schallintensität von 0.7 at laut Firmenprospekt des Geräteherstellers MSE. Die Gasbläschen wachsen bis zu einer kritischen Größe an: 11 μ laut MSE; 150 μ nach Hughes et al. (33), berechnet aus der dort (S.109) angegebenen Gleichung für 20 kHz. Während der Phase des Anwachsens treten deutliche frequenzabhängige Vibrationen auf, die Mikroströmungen in der unmittelbaren Umgebung der Bläschen verursachen; nach Erreichen der "Resonanzgröße" implodieren die Kavitationen unter Erzeugung hoher Scherkräfte, Temperaturen und Druckwellen: 10^4 K bzw. 10^6 at; Anwachsen und Kollaps ereignen sich in einer Zeit kleiner als ein Schallzyklus (33; MSE Publ. No.502), also kleiner als 50 μsec bei 20 kHz. Die physikalischen Folgen der Implosion von Kavitationen verursachen zwar Hämolyse, sind hierzu aber nicht essentiell; es genügen bereits die Mikroturbulenzen um die vibrierende Gasblase, um ausreichende Scherkräfte zu erzeugen (33, 55).

Nach Tarssanen (72) verläuft die Ultraschall-Hämolyse nach dem "Alles-Oder-Nichts"-Prinzip. Membranvorschädigungen (proteolytisch, lipolytisch, mechanisch), welche die osmotische Resistenz der Erythrozyten herabsetzen, haben gemäß der genannten Arbeit keinen Einfluß. Hieraus schließt Tarssanen, daß Membraneigenschaften die Ultraschall-Fragilität nicht beeinflussen. Es seien vor allem Volumen und Viskosität des Zellinnern bestimmend. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, daß hypotone Volumenvergrößerung in Suspensionsmedien von 0.5 g% NaCl die Empfindlichkeit erhöht, hypertone Zellschrumpfung in Medien ab 1.5 g% NaCl dagegen stabilisierend wirkt (Abb.3). Beschallung in 0.75 g% NaCl erbrachte keinen signifikanten Unterschied zur isotonen Kontrollmessung. In Übereinstimmung mit der Behauptung von Tarssanen zeigt der fehlende Effekt von HN3 (Abb.6), daß die durch Rigidifizierung der Membran veränderten mechanischen Eigenschaften von der Ultraschallmethodik nicht erfaßt wurden.

Es fehlt allerdings der Beweis, daß die von Tarssanen gesetzten Membranvorschädigungen auch zu einer unmittelbaren Änderung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses in der Größenordnung führen, wie sie von Seeman in mehreren Publikationen (z.B. in seiner Übersichtsarbeit, 62) als Effekt von Anästhetika postuliert wird. Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis müßte ebenfalls einen gewissen Einfluß besitzen, denn es sind z.B. sphärische einzellige Organismen grundsätzlich empfindlicher als stäbchenförmige (MSE Tech. Publ. No.502). Chlorpromazin, Na-dodecylsulfat und HN3 zeigten keinen stabilisierenden oder destabilisierenden Einfluß auf die Ultraschall-Fragilität. Somit findet sich mit dieser Methodik kein Anhalt für eine primäre Wirkung dieser Pharmaka auf das Oberflächen-Volumen-Verhältnis.

Erhöhte Viskosität im Zellinnern senkt die Ultraschall-Fragilität des Erythrozyten; Scherkräfte hoher Energie, wie z.B. Implosion ultraschall-induzierter Kavitationen, fördern seine Eigenschaft als Flüssigkeitstropfen zutage; mit Hilfe niedrig-energetischer Scherkräfte können dagegen eher die Membraneigenschaften beobachtet werden (72). In der vorliegenden Arbeit spricht der beobachtete Einfluß der Osmolarität des Suspensionsmediums auf die Ultraschall-Fragilität dafür, daß die Viskosität des Zellinnern eine größere Bedeutung für die Fragilität haben muß als das Zellvolumen. Abb.3 zeigt, daß die Stabilisierung im hypertonen Medium um den Faktor 6 größer ist, als die Destabilisierung in hypotoner Suspension. Eine Ausdehnung des Meßbereichs über 3 g% NaCl bzw. unter 0.5 g% NaCl wird diesen Unterschied kaum noch vergrößern: bei höherer NaCl-Konzentration ist der Kurvenverlauf fast abszissenparallel; ab 0.46 g% NaCl setzt osmotische Hämolyse ein. Verglichen mit isotonen Verhältnissen ist die Volumenzunahme des Erythrozyten dem Betrag nach in 0.5 g% NaCl deutlich größer als seine Volumenabnahme in 3 g% NaCl. Im Gegenzug ändert sich die Viskosität des Zellinnern bei Messung im hypotonen

Medium lediglich proportional zur Osmolaritätsabnahme, wogegen sie im hypertonen wegen Bildung von Prazipitaten bzw. Kristallen überproportional ansteigt (57). Daß mehr Stabilisierung als Destabilisierung erreicht werden kann, wird somit besser durch Viskositätsänderung erklärt als durch Volumenschwankung.

Bessis et al. (3) beschreiben die Verformbarkeit des Erythrozyten als abhängig von intra- und extrazellulärer Viskosität. Sie definieren Verformbarkeit als Fähigkeit zur Längenzunahme unter Einfluß von Scherkräften. Mit steigender intrazellulärer Viskosität nehme die Verformbarkeit ab; sie nehme zu mit steigender Viskosität des Suspensionsmediums; entscheidend sei die Differenz zwischen intra- und extrazellulärer Viskosität. Es liegt der Gedanke nahe, daß die geringere Verformbarkeit in 3 g% NaCl die Stabilisierung gegen Ultraschall bewirkt. Dagegen spricht aber die Beobachtung, daß erhöhte Viskosität im Suspensionsmedium ebenfalls gegen Ultraschall stabilisiert (Abb.7, 8, 9), obwohl sich die Verformbarkeit hier gemäß den genannten Autoren erhöht. Mithin kann die Verformbarkeit nicht der entscheidende Parameter sein, der über Stabilisierung oder Destabilisierung entscheidet.

Die verminderte Empfindlichkeit in höher viskösen Medien äußert sich zum einen durch größere Halbwertszeit; zum anderen wird das Zwei-Kompartiment-Modell wahrscheinlicher, jedenfalls wenn man die Güte der Anpassung an einfache bzw. doppelte e-Funktion betrachtet (vgl. Abb.7 und 8). Wie oben diskutiert, entfällt die Veränderung der Verformbarkeit als Erklärung. Die beobachtete Stabilisierung kann somit auf verminderter Bewegung der Zellen im zäheren Flüssigkeitsstrom beruhen. Wenn man annimmt, daß die Verteilung der Schallintensität im Probengefäß genügend inhomogen ist, so muß sich ein Teil der Zellpopulation in einer "kritischen Zone" stärkerer Schallintensität aufhalten und wird relativ schnell zerstört. Der Austausch mit den Randzonen, wo die Zellen weniger belastet sind, ist nun aufgrund des zähflüssigen Mediums behindert, so daß der zeitlich verzögerte Nachschub in die "kritische Zone" mit der dortigen Zellzerstörung nicht wie bei normaler Viskosität schritthalten kann. Nach einer gewissen Anfangsphase kann der Einstrom intakter Zellen in diese Zone höherer Schallintensität zum limitierenden Faktor werden, was den flacheren Kurvenverlauf bei längeren Beschallungszeiten erklärt.

Die Vorstellung von einer "kritischen Zone" im Bereich des schallübertragenden Stabes, in der die eingespülten Erythrozyten nach dem "Alles-Oder-Nichts"-Prinzip zerstört werden, erklärt die exponentielle Zeitabhängigkeit der Hämoglobinfreigabe und das Fehlen jeglicher Einflüsse von Pharmaka auf die Ultraschall-Fragilität. Zum einen ist die Ultraschall-Hämolyse u.a. eine Funktion der Einspülrate in das "kritische" Kompartiment. Behinderung des Einspülens z.B. durch höher visköses Suspensionsmedium vermindert die Hämo-

lyse. Scherkräfte spielen höchstens eine untergeordnete Rolle, denn sonst müßte das höher visköse Medium wegen verstärkter Zellverformung die Hämolyse erhöhen. Stattdessen werden Erythrozyten entweder ganz oder gar nicht zerstört, z.B. durch hohe Energiefreisetzung in unmittelbarer Nachbarschaft implodierender Kavitationen. Unter solch extremer Belastung kann eine Protektion oder Destabilisierung der Membran durch Pharmaka keine Bedeutung mehr haben. Lediglich die Veränderung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses hätte einen Einfluß besitzen dürfen; solches wurde aber nicht beobachtet.

Hämolyse durch Scherkräfte

Porenpassage

Der Durchtritt durch Kanäle mit 3μ Durchmesser erfordert eine starke zylindrische Verformung der Erythrozyten. Da mit zunehmender Länge des Zylinders bei abnehmendem Durchmesser unter Konstanz des Volumens die benötigte Membranoberfläche wächst, sind der Deformierung gemäß der endlichen Membranreserve Grenzen gesetzt. Nach Johannson et al. (34) beträgt der kleinste zylindrische Durchmesser, den der durchschnittliche Erythrozyt ohne Änderung von Oberfläche oder Volumen annehmen kann, etwa 3μ und entspricht somit dem Durchmesser der Filterporen.

Infolgedessen muß überlegt werden, ob für eine größere Zellzahl die Hämolyse schon durch Membranüberdehnung erzwungen wird. Der Porendurchmesser der benutzten Filter ist unter diesem Gesichtspunkt grenzwertig. Es interessiert daher zunächst, ob der Porenkanal das Zellvolumen überhaupt vollständig aufnimmt. Wenn nicht, können die Erythrozyten ober- und unterhalb des Kanals die membransparende Kugelform annehmen und so problemlos passieren.

Das Volumen des Porenkanals beträgt bei 3μ Durchmesser und 11μ Länge $78\mu^3$. Nach den Wissenschaftlichen Tabellen von Geigy (27) besitzen gesunde Erythrozyten ein mittleres Volumen von $86.1\mu^3$ bei einer Standardabweichung von 6.3. Das Porenkanalvolumen ist gleich dem mittleren Erythrozytenvolumen minus 1.26*s:

$$78\mu^3 = 86.1\mu^3 - 1.26 * 6.3\mu^3.$$

Daher haben etwa 10% der gesunden Zellen ein kleineres Volumen und werden im Porenkanal bis an die Grenze zur Membrandehnung verformt.

Diese vereinfachte Schätzung vernachlässigt eine etwaige positive Korrelation zwischen Erythrozytenvolumen und individuellem kleinsten zylindrischen Durchmesser. In diesem Fall würden die kleineren Individuen, die vollständig in

das Kanalvolumen eintauchen, auch einen kleineren zylindrischen Durchmesser tolerieren und aus diesem Grund ebenfalls keine Probleme aufwerfen. Zudem verneint Burton (13) Schwankungen des kleinsten zylindrischen Durchmessers innerhalb einer Erythrozytenpopulation; ein Überschreiten des kritischen Wertes von 3µ ist nach seinen Überlegungen nicht zu erwarten. Da weiterhin das hier benutzte PBS-Suspensionsmedium mit 305 bis 320 mOsm/kg gegenüber Plasma leicht hyperton ist und grenzwertige Belastung dank einer tangentialen Membrandehnbarkeit von ca. 4% (10, 11, 26) keineswegs gleich Hämolyse bedeutet, kann das Prinzip des kleinsten erreichbaren zylindrischen Durchmessers das Hämolyseverhalten während der Filterpassage nicht entscheidend beeinflussen.

Stattdessen zeigt sich eine exponentielle Abhängigkeit des nach Filtration intrazellulär verbliebenen Hämoglobins vom Filtrationsdruck. Die angepaßten e-Funktionen liegen für die Druckdifferenz 0 mm Hg bei knapp 100% und stimmen gut mit den Kontrollmeßwerten ohne Filterpassage überein; eine während der Aufbereitung der Erythrozytensuspensionen abgelaufene Vorhämolyse von ca. 5%-7% erscheint zudem plausibel. Demgemäß kommt eine druckdifferenzunabhängige Hämolyse aufgrund Überschreiten der Verformbarkeitsgrenze nicht in Betracht; die Zellen besitzen grundsätzlich die Fähigkeit zur Porenpassage. In diesem Zusammenhang sei auf die Ergebnisse von Chien et al. (15) hingewiesen, die einen quantitativ ähnlichen Verlauf der Hämoglobinfreisetzung bei vergleichbarem Vorgehen beobachtet hatten.

Hämoglobinfreisetzung durch Scherkräfte

Die mit dem Filtrationsdruck steigenden Wandscherkräfte im Porenkanal können bei den hier beschriebenen Filtrationsversuchen als ursächlich für die Hämoglobinfreisetzung angesehen werden. Die Berechnung der auftretenden Kräfte erfolgt nach Schmidt-Schönbein et al. (58) nach der Gleichung

$$Tw = \frac{dP * r}{2 * l};$$

Tw = Wandscherkraft,
dP = Druckgradient,
l = Länge des zylindrischen Kanals.

Der ursächlichen Bedeutung der Wandscherkräfte widersprechen allerdings Chien et al. (15). Sie beobachteten, daß die Hämoglobinfreisetzung mit steigendem Durchmesser der Filterporen abnimmt, obwohl die Wandscherkräfte gemäß obiger Formel zunehmen müssen. Eigene Messungen mit Filtern von 5µ Porendurchmesser (Ergebnisse hier nicht aufgeführt) zeigen ebenfalls eine geringere Hämoglobinfreisetzung als beim Porendurchmesser 3µ.

Entsprechend den vorangegangenen Ausführungen über die Porenpassage decken sich die Volumina der Erythrozyten und des Porenkanals von 3μ Durchmesser in etwa, so daß in der Mitte der Durchtrittsphase der Erythrozyt die Porenkanalform annimmt und inniger Kontakt zwischen Wand und Membran stattfindet. Bei größeren Porendurchmessern kann der Abstand aber auch größer werden; dann müssen die Scherkräfte an der Membran selbst entsprechend einem paraboloiden Strömungsprofil rapide absinken. Dieser Umstand kann die geringere Hämolyse mit größeren Poren erklären und läßt für einen Durchmesser von 3μ den Kausalzusammenhang zwischen Wandscherkraft und Hämoglobinfreisetzung zu.

Die aus den angepaßten e-Funktionen ermittelten Halbwertsdrucke entsprechen daher Scherkräften, deren Einwirken auf die Membran die untersuchte Erythrozytenpopulation zur Freigabe der Hälfte ihres Hämoglobins veranlaßt. Für Frischblut ergibt sich so eine halbmaximal schädigende Wandscherkraft von ca. 6690 (95%-Konfidenzintervall: 6081 bis 7436) Nm^{-2}. Die für Erythrozyten aus überalterter ACD-Konserve ermittelte doppelte e-Funktion liefert naturgemäß zwei Angaben: 412 (282 bis 760) Nm^{-2} und 2533 (1482 bis 9272) Nm^{-2}, wobei erstere für ca. 80%, die zweite für 20% der Population gilt. Dem liegt formal die Vorstellung zweier verschieden empfindlicher oder verschieden stark geschädigter Subpopulationen zugrunde. Erythrozyten aus den über 3 Monate aufbewahrten ACD-Konserven sind demnach deutlich empfindlicher gegen tangentiale Scherkräfte als frisch gespendete Zellen. Bei Abb.10 finden sich die angepaßten Funktionen und die zugehörigen Parameter.

Ablauf der Hämoglobinfreisetzung

Verliert mit der beschriebenen Filtrationsmethodik ein definierter Prozentsatz der eingesetzten Erythrozyten durch völlige Destruktion sein gesamtes Hämoglobin und der Rest bleibt intakt ("Alles-oder-Nichts"-Prinzip), oder geschieht dies (mehr oder weniger gleichmäßig) durch transiente Lecks, wie sie Seeman (60) bei der osmotischen Hämolyse beschreibt?

Zu diesem Zweck sollen die eigenen Daten denen von Chien et al. (15) gegenübergestellt werden. Die Autoren beschreiben ein vergleichbares Vorgehen mit Polycarbonatfiltern von 3μ Porengröße. Der druckabhängige Verlauf der Hämoglobinfreigabe ist sowohl von Kurvenform wie auch quantitativ mit den eigenen Ergebnissen vergleichbar. Der aus Fig.5 der zitierten Arbeit geschätzte Druckgradient, der zur halbmaximalen Hämoglobinfreisetzung führt, liegt um ca. 20% höher als die eigene Berechnung von 740 mm Hg. Dies entspricht einem Unterschied intrazellulär verbliebenen Hämoglobins von etwa 7% für den genannten Halbwertsdruck.

Für die Kalium-Freisetzung wurde von Chien et al. in Fig.6 der genannten Publikation eine im Vergleich zur Hämoglobinfreisetzung ähnliche Kurvenform mit steilerem Verlauf vorgewiesen, wovon sich ein halbmaximal schädigender Druckgradient von etwa 200 mm Hg ablesen läßt. Das Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin (MCH) im Filtrat ist bei diesen Autoren ebenfalls vom Filtrationsdruck abhängig. Der Quotient

$$MCH_f/MCH_o$$

MCH_f = MCH im Filtrat
MCH_o = MCH in der Ausgangssuspension

stimmt bei den genannten Autoren gut überein mit der Differenz des Hämolyse-Index zu 1. Diese Differenz entspricht dem Prozentsatz intrazellulären Hämoglobins, der in der vorliegenden Arbeit benutzt wird. Das Mittlere Korpuskuläre Volumen (MCV) ändert sich nicht mit dem Druckgradienten. Im Transmissions-Elektronenmikroskop sehen Chien et al. (15) bei den mit 740 mm Hg filtrierten Zellen eine stark variierende Hämoglobindichte von fast normal bis fast leer. Leider fehlt eine Angabe darüber, ob der Anteil der Zwischenstufen klein oder groß war.

Die zitierten Daten sprechen deutlich gegen ein reines "Alles-oder-Nichts" mit völliger Destruktion eines definierten Prozentsatzes der Zellpopulation. Der Quotient MCH_f/MCH_o hätte sonst über den ganzen Druckbereich konstant bleiben müssen, da Membranfragmente und Ghosts mit einem kleineren Volumen als 30 μ^3 im Coulter-Counter nicht erfaßt worden sind; siehe hierzu Methodikbeschreibung in der genannten Arbeit. Weiterhin ist aus der Konstanz des MCV und der variierenden zellulären Hämoglobindichte zu schließen, daß die Erythrozyten sich mehr oder weniger alle, aber in unterschiedlichem Ausmaß an der Hämoglobinfreisetzung beteiligen.

Die Präferenz der Kalium-Freigabe paßt zunächst eher zur Vorstellung von zeitlich befristeten Lecks (vgl. hierzu auch die Diskussion bei Chien et al.). Diese könnten mit steigendem Druckgradienten größer werden und/oder länger bestehen bleiben. Wenn aber bei knapp halbmaximal schädigender Druckdifferenz elektronenmikroskopisch fast völlig normal dichte neben fast leeren Exemplaren vorgefunden werden, müßte die Bereitschaft zur Porenbildung bzw. zum Wiederverschluß zwischen den Individuen schon sehr verschieden sein, da eine so große Inhomogenität der Filterporen laut Materialprospekt des Herstellers nicht vorhanden ist.

Zwischen dem Durchmesser des Hämoglobinmoleküls (60Å; siehe 15) und dem Durchmesser des hydratisierten Kalium-Ions (4Å; siehe 70) besteht ein Unterschied um den Faktor 15. Demgegenüber haben Chien et al. (15) nur eine maximal zweifach größere K^+-Freisetzung ermittelt. Für den Ausstrom von Zellinhalt als Folge der Filtration könnte also weniger die Größe der Lecks, sondern vielmehr deren Öffnungszeit verantwortlich sein, so daß die unter-

schiedlichen Diffusionskonstanten in wässriger Lösung zum Tragen kommen. Diese Annahme erfordert schon bei niedrigen Druckdifferenzen Löcher in der Größenordnung von Hämoglobinmolekülen. In Übereinstimmung hiermit zeigt Abb.10 Hämolysebeginn schon bei kleinen Drucken.

Wenn die Öffnungszeit bestimmender Parameter für die Hämoglobinfreisetzung ist, muß sie vom Druckgradienten abhängen. Zudem müssen die Zeiten bei den einzelnen Lecks stark variieren. Bei diesen Betrachtungen fällt allerdings die Vorstellung schwer, daß bei gleichen "Reparaturmechanismen" die einen Individuen so schnell arbeiten, daß sie kaum Hämoglobin verlieren, andere aber bis zum Abschluß der "Reparatur" per diffusionem fast alles verloren haben. Ein strenger kausaler Zusammenhang zwischen Öffnungszeit und Hämoglobinfreisetzung kann somit ebensowenig nachgewiesen werden, wie zwischen Größe der Membranlecks und Hb-Freisetzung.

Resealing

Die Fähigkeit der Membran zum Wiederverschluß der durch tangentiale Belastung entstandenen Membranlecks, das sog. "resealing", ist nach Johnson et al. (35) abhängig von der Anwesenheit divalenter Kationen; die effektiven Konzentrationen für Ca^{++} und Mg^{++} betragen 40 bzw. 200 µmol/l. Das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Suspensionsmedium (PBS) enthielt solche Kationen allerdings nicht. Chien et al. (15) hingegen benutzten Ringerlösung mit Zusatz von 2.5 millimol/l Kalzium-Ionen und Glukose.

EDTA verhindert das "resealing" der Erythrozytenmembran (5), da es mit Ca^{++} Chelate bildet. Unter der Annahme einer nur vorübergehenden Durchlässigkeit der Membran für Makromoleküle müßte EDTA-Zugabe zur Suspension vor der Filtration einen deutlichen destabilisierenden Effekt im Vergleich zur Kontrolle ohne EDTA aufweisen, da einmal entstandene Lecks nicht mehr "repariert" werden und deswegen bis zum Zeitpunkt der Messung kein intrazelluläres Hämoglobin mehr nachgewiesen werden kann. Kontroll-Erythrozyten dagegen müßten diese Permeabilität nach Entlastung der Membran unter Anwesenheit freier bivalenter Kationen wieder verlieren und hätten so für die Hämoglobinfreisetzung weniger Zeit zur Verfügung. Wenn also bei einem bestimmten Druckgradienten die Kontroll-Erythrozyten die Hälfte ihres Hämoglobins verlieren, dann müßte die theoretisch erwartete Destabilisierung bei den mit EDTA vorinkubierten Zellen zu fast völligem Hb-Verlust führen, d.h. in Abb.14 hätten sich die Meßpunkte dem Wert -50% nähern müssen; die möglichen Prozentdifferenzen sind wegen des Auswertungsverfahrens auf ±50% begrenzt, siehe Methodik unter "Ausschaltung der Vorhämolyse".

Bei der höchsten angewandten EDTA-Konzentration (5mM) betrug der destabilisierende Effekt auf Frischblut aber nur 10% (P-alpha gegen Kontrolle = 30%), mit der niedrigsten Konzentration (0.5mM) wurde sogar eine geringe "Stabilisierung" von 5% beobachtet (P-alpha gegen Kontrolle 53%!). Diese niedrigste EDTA-Konzentration genügt zur Maskierung der von den Erythrozyten eingebrachten bivalenten Kationen bereits im Überschuß. Harrison et al. (32) geben eine intrazelluläre Magnesiumkonzentration von über 3 millimol/l und für Kalzium von 15.8 µmol/l an, bezogen auf die Volumeneinheit gepackter Erythrozyten. Das Kalzium sei fast ausschließlich in der Membran lokalisiert. Bei einem Hämatokrit von 0.5% verringert sich die Konzentration in der Suspension auf unterschwellige Werte für beide Ionen.

Zumindest bei den Zellen, die durch Diffusion fast ihr gesamtes Hämoglobin verloren haben, darf man wohl annehmen, daß sie auch ihre freien bivalenten Kationen an das Suspensionsmedium abgegeben haben, so daß diese ein "resealing" nicht mehr unterstützen können. Es bliebe also noch das membrangebundene Kalzium, das aber nach Harrison et al. (32) von 5 mM EDTA in isotonem Medium zu 90% entfernt wird.

Vergleichen wir nochmals die Werte für intrazelluläres Hämoglobin bei einem halbmaximal schädigendem Druckgradienten von etwa 800 mm Hg, so liegen die eigenen Daten in kalziumfreier Suspension ca. 7% niedriger als die von Chien et al. (15) in 2.5 millimol/l Ca^{++} erhobenen; EDTA-Zusatz könnte eine weitere Senkung um etwa 10% bewirken. Eine Senkung um 50% kommt aber insgesamt nicht zustande. Wenn jedoch "resealing oder nicht" keinen entscheidenden Einfluß besitzt, kann auch die Wiederverschlußzeit (ebenso wie die Porengröße) nicht als druckabhängiger Parameter für die Hämoglobinfreisetzung gelten.

Mit den genannten Daten am ehesten vereinbar ist die Vorstellung, daß ein Teil der Population Lecks bildet, die die gesamte Hämoglobinfreisetzung nur unwesentlich beeinflussen. Bei dem anderen Teil ist dagegen die Leckage so umfangreich und andauernd, daß "resealing oder nicht" keine Rolle spielt. Die von Chien et al. (15) beobachteten Zwischenstufen mögen dann einer Minderheit zuzurechnen sein, die kurzfristige Lecks bildet und damit die geringen Effekte bei Verhinderung des "resealing" erklärt. Die Mehrheit der filtrierten Erythrozytenpopulation hat dementsprechend fast alles oder fast kein Hämoglobin verloren.

Hämolyse durch Scherkräfte: Literaturvergleiche

Die Angaben über das Ausmaß der Hämoglobinfreisetzung durch Scherkräfte sind in der Literatur je nach Versuchsbedingungen (vor allem Viskosität des Suspensionsmediums, Dauer der Krafteinwirkung) verschieden. Bessis et al. (3) beschreiben eine steigende Verformung bei gleichen Scherkräften, wenn die Differenz der Viskositäten (außen minus innen) positiver wird. Bei ihren Versuchen sei bei Scherkräften ab 100 Nm^{-2} Hämolyse aufgetreten; leider fehlen Angaben über Viskosität des Suspensionsmediums und Dauer der Scherkrafteinwirkung an dieser Stelle. Sutera et al. (71) haben mit einem Medium einer Viskosität von 1 cP erst ab 150 Nm^{-2} Zelldeformierung beobachtet; demnach müßte die halbmaximal schädigende Scherkraft deutlich größer sein.

Als Maß für die Empfindlichkeit der Erythrozytenmembran wird in der Literatur zumeist eine "Kritische Scherkraft" angegeben, die man aus dem sigmoiden Verlauf der Hämolyse-Scherkraft-Beziehung ableitet. Ein linearer Anteil des Kurvenverlaufs wird dabei zum Schnittpunkt mit der Scherkraftachse extrapoliert; damit sei ein Schwellenwert definiert, bis zu dem nur die ältesten bzw. am wenigsten resistenten Zellen zerstört werden, der gesunde Durchschnitts-Erythrozyt hingegen werde erst durch Scherkräfte jenseits der Schwelle geschädigt (vgl. z.B. 77).

Demgegenüber wurde in der vorliegenden Arbeit die Angabe eines 50% des Hämoglobins freisetzenden Druckgradienten bevorzugt, da dieser Wert genauer bestimmbar ist. Der rechnerische Zusammenhang zwischen Wandscherkraft und Druckgradient wurde bereits beschrieben. Das eindeutige Erkennen eines linearen Anteils dürfte insbesondere bei den von Williams (77) in Fig.1 gezeigten sigmoiden Kurven teilweise schwierig sein. Im übrigen erscheint die Abgrenzung einer Subpopulation der "schwächsten und ältesten" Individuen gegenüber der Hauptpopulation etwas willkürlich.

Die kritischen Scherkräfte liegen bei Williams (77) für 1, 5 und 10 min Expositionsdauer bei 86, 59 bzw. 42 Nm^{-2}; Viskosität des Suspensionsmediums (10% Dextran) war 22 cP. Rooney (55) erzeugt periodische Scherkräfte in einem Suspensionsmedium von 31 cP mit Hilfe einer durch Ultraschall von 20 kHz vibrierenden Gasblase. Die Dauer eines Halbzyklus beträgt bei 20 kHz 25 μsec; es wurde für 5 min beschallt. Als kritischen Scherkraftwert gibt Rooney 450 Nm^{-2} an.

Nevaril et al. (50) benutzten ein konzentrisches Viskometer zur Scherkrafterzeugung und ermittelten eine Hämolyseschwelle von 300 Nm^{-2}. Williams et al. (78) lassen einen Draht transversal mit einer Frequenz von 20 kHz in einer Suspension mit 13% Dextran (31cP) oszillieren; Mitteilungen über die Beschallungsdauer fanden sich nicht. Die kritische Scherkraft wird mit 560

Nm^{-2} angegeben. Keshavia (37) und Bacher et al. (1) nennen einen kritischen Scherkraftwert von 500 Nm^{-2} nach einer einmaligen Exposition von ca. 10 msec Dauer (Viskosität des Suspensionsmediums nicht angegeben). Leverett et al. (44) erhielten im Couette-Zylinder einen kritischen Wert von 150 Nm^{-2} bei einer Expositionsdauer von 120 sec.

Schätzung der Expositionszeit

Die Dauer der Scherkraft-Exposition eines einzelnen Erythrozyten während der Filterpassage wird näherungsweise mit der Zeit angegeben, die das Volumen einer Flüssigkeitssäule von 3µ Durchmesser und 11µ Länge (Dimensionen des Filterporen-Kanals) für den Durchtritt durch den Porenquerschnitt benötigt. Legt man eine Filterfläche von ca. 64 mm^2 zugrunde, die die fertig montierte Anordnung freiläßt, sowie eine Dichte von $2*10^6$ Poren/mm^2, so errechnet sich mit Hilfe des Porenvolumens ein gesamtes freies Porenkanalvolumen von ca. 10 µl. Bei einer Druckdifferenz von 150 mm Hg belief sich die mit freiem Auge beobachtete Durchlaufzeit von 1 ml Erythrozytensuspension auf 0.5 bis 1 sec; somit ergibt sich bei diesem Druck eine geschätzte Passagezeit von 5 bis 10 µsec.

Unter Vernachlässigung der Verzögerung, die durch Formänderung des höherviskösen Zellplasmas auftritt, muß die Einwirkdauer tangentialer Scherkräfte auf die Erythrozytenmembran bei 150 mm Hg in der genannten Größenordnung liegen. Das Ausmaß dieser Verzögerung ist deswegen schlecht abzuschätzen, da die genannte Durchlaufzeit in 260 milliosmolarem Medium beobachtet wurde. Der Unterschied der Viskositäten von Zellplasma und Medium wird zwar kleiner, die Verformbarkeit der angeschwollenen Zelle aber schlechter, so daß diese beiden Wirkungen gegeneinander arbeiten.

Jedenfalls läßt der Vergleich mit den Angaben von Chien et al. (15) die eigenen Beobachtungen plausibel erscheinen. Aus der graphischen Darstellung von Durchflußrate gegen Druckdifferenz (Fig.2 der zitierten Arbeit) läßt sich die Porenverweildauer eines Suspensionselementes abschätzen: Die Flußraten wurden in ml/sec durch 10^6 Poren angegeben; die wiederum besitzen bei 3µ Durchmesser und 11µ Länge eine Volumensumme von $9.2*10^{-5}$ ml. Für 150 mm Hg Druckdifferenz und 3µ Porendurchmesser wird 1.2 ml/sec abgelesen, woraus sich eine Verweildauer von ca. 75 µsec errechnen läßt. Daß die so berechnete Expositionszeit um ca. eine Zehnerpotenz höherliegt als die eigene Schätzung, paßt gut zur Tatsache, daß Chien et al. (15) einen dreifach größeren Hämatokrit gewählt haben: 1.5% gegenüber 0.5% bei der vorliegenden Untersuchung.

Nimmt man nun die erwähnte graphische Darstellung, um die Flußraten bei 150 und 700 mm Hg zu vergleichen, läßt sich eine ca. 3.8-fach kürzere Verweildauer beim höheren Druckgradienten ermitteln: 150 mm Hg entsprechen 75 µsec 700 mm Hg dagegen 20 µsec. Überträgt man den Faktor 3.8 auf die eigene Zeitschätzung, so gelangt man mit den halbmaximal schädigenden Druckwerten von ca. 700 mm Hg für gesunde Erythrozyten (s.o.) auf eine Verweildauer von 1.3 bis 2.6 µsec. Dieses Extrapolieren auf höhere Druckgradienten dürfte zulässig sein, da ein weiteres "shear thinning" des Zellplasmas gemäß der Auftragung von relativem Widerstand gegen Druckdifferenz in Fig.3 der o.a. Arbeit zwischen 150 und 700 mm Hg bei 3µ-Porendurchmesser nicht mehr stattfindet.

Eine solche Expositionsdauer im Mikrosekundenbereich ist deutlich kürzer als die Einwirkzeiten, mit denen die in der Literatur gefundenen kritischen Scherkräfte bestimmt wurden. Zudem findet bei der beschriebenen Filtermethode nur eine einmalige Exposition des Erythrozyten statt. Es erscheint plausibel, wenn in der vorliegenden Arbeit unter so kurzer einmaliger Exposition von ca. 2 µsec Scherkräfte von etwa 7000 Nm^{-2} nötig sind, um die Hälfte des Hämoglobins aus gesunden Erythrozyten freizusetzen, andererseits die Hämolysierung nur der "ältesten und schwächsten" Individuen bei vergleichsweise langen Expositionszeiten z.B. im Zehnminutenbereich nach Williams (77) nur Scherkräfte von unter 50 Nm^{-2} erfordert.

Einfluß der Zeit auf den hämolytischen Scherkrafteffekt

Die Bedeutung der Einwirkdauer tangentialer Scherkräfte auf das Hämolyseverhalten geht aus verschiedenen Arbeiten hervor. Aus den graphischen Darstellungen von Williams (77) lassen sich halbmaximal hämolysierende Scherkräfte ablesen. Für 1, 5 und 10 min Expositionsdauer ergeben sich so 200, 150 bzw. 90 Nm^{-2}. Diese Werte gelten für ein Suspensionsmedium mit einer Viskosität von 22 cP (10% Dextran). Sie müssen für 1 cP entsprechend höher liegen, da bei niedrigerer extrazellulärer Viskosität die Zellverformung durch Scherkräfte geringer ist (3). Die vorliegende Arbeit erweitert die Beschreibung der Zeitabhängigkeit in den Mikrosekundenbereich mit der Angabe von 7000 Nm^{-2} halbmaximal schädigender Scherkraft, gültig für 1 cP.

Williams (77) gibt weiterhin eine "kritische Expositionszeit" an, bis zu der nur die "ältesten und schwächsten" Erythrozyten geschädigt werden (vgl. kritische Scherkraft); gesunde Zellen überstehen diese Behandlung. Die kritische Zeit sei wiederum scherkraftabhängig, z.B. 5 sec. für 120 Nm^{-2}, 40 sec für 90 Nm^{-2}. Für hohe Scherkräfte wie z.B. 7000 Nm^{-2} müßte diese kritische Zeit unterhalb des Mikrosekundenbereichs liegen.

Die sonst in der Literatur vorgefundenen Zeitangaben sind aus bereits erwähnten Gründen für die Betrachtung des zeitabhängigen Effekts von Scherkräften zu ungenau, umso mehr wenn z.B. zwar Zeiten angegeben werden, diese aber für "wiederholte" Exposition gelten. Es wäre sicherlich lohnend, durch gezielte Änderung der Expositionszeit den doch großen Sprung von von 1 min zu 1 µsec zu überbrücken.

Die Hämoglobinfreisetzung als Funktion des Druckgradienten

Eine Abweichung der Meßpunkte (Druck, Prozent intrazelluläres Hämoglobin) vom Verlauf einer einfachen e-Funktion wurde besonders dann beobachtet, wenn die Erythrozyten durch Alterung, hypotones Suspensionsmedium oder destabilisierende Wirkstoffkonzentrationen empfindlicher gegen Scherkräfte geworden waren; vgl. hierzu Ergebnisse der Scherkraftmethode: "Tabelle der Signifikanzereignisse".

Mit der Kurvenanpassung einer Summe aus zwei e-Funktionen an die Meßpunkte wird die Vorstellung verbunden, daß die Gesamtpopulation der filtrierten Zellindividuen in zwei Subpopulationen zu unterteilen ist, die unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Scherkräfte aufweisen oder unterschiedlich stark geschädigt werden. Der Halbwertsdruck gibt die Empfindlichkeit, der Faktor vor dem Exponentialausdruck (Ao bzw. Bo) den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit an. Bei Untersuchung gesunder, frisch gespendeter Erythrozyten mag die Fraktion der "ältesten und empfindlichsten" Individuen so klein sein, daß sie von der angewandten Methodik nicht erfaßt wird. Bei überalterten oder sonstwie empfindlicher gemachten Zellen kann diese Fraktion wachsen, so daß zwei Kompartimente signifikant werden.

Selbstverständlich ist die Einteilung in eine empfindliche und eine weniger empfindliche Fraktion willkürlich, in Wirklichkeit sind fließende Übergänge zu erwarten. Dies müßte sich methodisch dahingehend äußern, daß sich bei Erhöhung der Anzahl der Meßpunkte die Anzahl der "signifikanten Kompartimente" mit erhöht, wenn man die entsprechenden Mehr-Kompartiment-Funktionen anpaßt.

Die Ablehnung des Zwei-Kompartiment-Modells geschieht dann zu Unrecht, wenn im Meßbereich bis 500 mm Hg nur der "steile" Kurventeil erfaßt wird, die Halbwertsdrucke also aufgrund geringerer Empfindlichkeit größer als 500 mm Hg sind. Bei höheren Druckdifferenzen könnte also durchaus noch ein flacherer Kurvenverlauf sichtbar werden und auf die Existenz eines zweiten Kompartiments hinweisen. Damit ist insbesondere dann zu rechnen, wenn sich die beiden Erythrozyten-Subpopulationen nicht a priori unterscheiden. Über das Vorkommen von etwa 10% "Doppelporen" (durch Überlappen einzelner Poren) bei den benutz-

ten Filtern wurde bei der Beschreibung der Materialien bereits berichtet. Eine solche zweite "Porenpopulation" kann eine unterschiedliche Schädigung der untersuchten Erythrozyten bewirken und dadurch die beobachtete Signifikanz von Zwei-Kompartiment-Modellen verursachen.

Die oben beschriebene Zeitabhängigkeit kann eine weitere Erklärung dafür sein, daß die Anpassung einer einfachen e-Funktion an einige Messungen nur unbefriedigend gelingt. Zum einen bewirkt eine Erhöhung der Druckdifferenz am Filter eine stärkere Membranschädigung wegen Steigerung der auftretenden Scherkräfte. Andererseits resultiert daraus auch eine verkürzte Einwirkdauer des schädigenden Agens, was der Hämoglobinfreisetzung wieder entgegenwirkt. Die einfache e-Funktion wird daher von einer noch nicht genau definierten zweiten Beziehung überlagert, die den Effekt der Expositionszeit beschreibt und die für die Abflachung des Kurvenverlaufs bei höheren Druckgradienten verantwortlich ist.

In dieser zweiten Gleichung müßte ein steigender Druckgradient als Erhöhung des halbmaximal schädigenden Druckwertes wirksam sein. Der Koeffizient im Exponenten der e-Funktion würde sich so mit steigendem x (d.h. Druck) verkleinern. Wird eine solche Abhängigkeit des Halbwertsdrucks von der angewandten Druckdifferenz vereinfachend als linear angenommen, so gilt:

$$HWD = m*x + c;$$

HWD = halbmaximal schädigender Druckgradient,
m = Steigung als Maß für die Zeitabhängigkeit,
x = Druckgradient als unabhängige Variable,
c = theoretischer Halbwertsdruck, der für unendliche Expositionszeit gilt.

Der Parameter m wird größer bei stärkerem Einfluß der Expositionszeit auf den halbmaximal schädigenden Druck; er geht gegen 0 bei fehlender Zeitabhängigkeit, also bei fehlender plastischer Membraneigenschaft. Die Druckvariable x ist der Expositionszeit umgekehrt proportional. Der Konstanten c nähert sich der Halbwertsdruck, wenn der angewandte Druckgradient gegen 0 und somit die Expositionsdauer gegen Unendlich geht.

Für den Koeffizienten a der im methodischen Teil bereits definierten einfachen e-Funktion gilt:

$$a = \frac{\ln(2)}{HWD} = \frac{\ln(2)}{m*x + c} .$$

Nach Einsetzen in die e-Funktion ergibt sich:

$$Y = Ao * e^{\frac{-x*\ln(2)}{m*x + c}}.$$

Nachdem die Konstante c ein von der aktuellen Expositionsdauer unabhängiger Wert ist, könnte man mit ihrer Hilfe auf die Empfindlichkeit der Membran bei unendlich langer Exposition extrapolieren. Andererseits hängt m von der Ausprägung plastischer Membraneigenschaften ab. Fehlte nämlich die plastische Eigenschaft, so würde die Steigung m gleich null sein. Es bestünde dann keine Abhängigkeit des Halbwertsdruckes von der Expositionszeit und obige Gleichung würde in die normale e-Funktion übergehen.

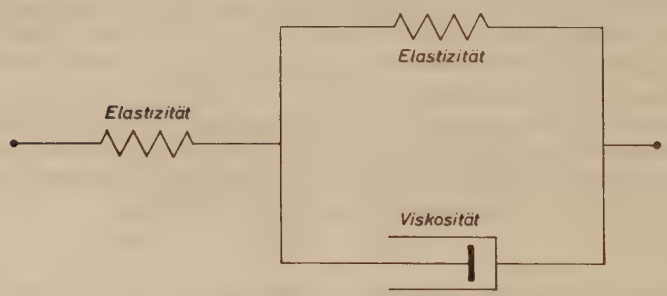
Bei diesen Betrachtungen darf nicht vergessen werden, daß die Annahme der Linearität willkürlich getroffen wurde. Lediglich in einem mehr oder weniger engen Druckbereich mag die Gerade eine gute Näherung darstellen. Dies gilt augenscheinlich für die von Williams (77) dargestellte Abhängigkeit des hämolytischen Effekts von der Dauer der Scherkrafteinwirkung im Bereich von 1 bis 10 Minuten. Läßt man allerdings bei der Grenzwertbetrachtung die Druckdifferenz unendlich groß werden, so geht der Koeffizient des Exponenten gegen -ln(2)/m; die Funktion nähert sich dann also einer Abszissenparallelen, die umso abszissennäher liegt, je kleiner m ist. Je stärker hingegen der Einfluß plastischer Membraneigenschaften ausgeprägt ist, desto kleiner ist das Maximum an Hämoglobinfreisetzung, das auch durch noch so große Drucke nicht überschritten werden kann. Daß die Anpassung an einfache e-Funktionen bei gesundem Frischblut gelingt, mag z.B. an den höheren Halbwertsdrucken liegen: es wurden einfach nicht genügend große Drucke angewandt, um die Annäherung an eine Abszissenparallele erkennen zu können.

Viskoelastisches Membranmodell

Die Zunahme der Empfindlichkeit der Membran gegen tangentiale Scherkräfte bei längerer Expositionszeit läßt an eine plastische Umordnung der Membranbestandteile während genügend langer Dehnung denken. Zur Erläuterung wird zunächst das von Williams (77) beschriebene Modell auf eine Feder (elastische Komponente) und eine Ölpumpe (plastisches Verhalten), die in Serie geschaltet sind, vereinfacht. Eine schnelle (rechteckförmig zunehmende) Dehnung wirkt zunächst nur auf die Feder. Die Ölpumpe wird während des anhaltenden Dehnungszustandes reagieren, auch nachdem die Längenänderung des gesamten Systems bereits vollzogen ist. Mit anderen Worten wird bei hochfrequenter Längenänderung vor allem die Feder mitgehen und die Ölpumpe relativ unverändert bleiben, bei niederfrequenten Änderungen geht vor allem die Pumpe mit und die Feder ändert ihre Länge vergleichsweise wenig.

Ein erweitertes Modell braucht man zur Erklärung der Ergebnisse von Chien et al. (16), die einen biphasischen Verlauf beim Ansaugen eines Erythrozyten in Mikropipetten von 0.3μ bis 0.8μ Innendurchmesser beschreiben. Es werden zwei Zeitkonstanten angegeben: eine schnelle von 20 bis 120 msec ist indirekt proportional zur Verformungsgröße (Einzugslänge/Radius), eine langsamere von 5 sec ist davon unabhängig. Bei der Entspannung registrieren Chien et al. (16) dagegen einen monophasischen Verlauf mit einer Zeitkonstante von 150 msec nach 20 sec lang anhaltendem Ansaugdruck.

In unserem Modell würde demnach bei rechteckförmigem Einschalten des Ansaugdruckes die Feder gedehnt und schneller Längenzuwachs beobachtet (kurze Zeitkonstante). Während des 20 sec langen Bestehens der verformenden Kraft erlaubt die Bewegung der Ölpumpe eine allmähliche weitere Längenzunahme, was einer Umordnung der Membranbestandteile entspricht. Die langsame Längenzunahme nähert die Membran exponentiell einer Maximallänge. Dieser Umstand erfordert die Annahme einer weiteren, parallel zur Ölpumpe geschalteten Feder, die die weitere Ausdehnung mit einer Gegenkraft begrenzt.



Mechanisches Modell für das viskoelastische
Verhalten eines Stoffes (nach Gerthsen et al., 28)

Den monophasischen Entspannungsverlauf kann das Modell ebenfalls erklären: Bei Annäherung an den Ausgangszustand dient die parallel geschaltete Feder als rückstellende Kraft. Wegen des verlangsamten Ablaufs (plastischer Vorgang) wird die in Serie geschaltete Feder kaum tangiert; sie beeinflußt nicht merklich das Rückstellverhalten. Das parallel geschaltete Teilmodell verursacht also fast allein die exponentielle Wiederannäherung an den Ausgangszustand.

Bei nur kurzdauernder Aspiration (bis zu 2 sec) haben Chien et al. (16) beobachtet, daß die Kurvenverläufe von Dehnung und Entspannung zusammenfallen. Dies entspricht der Modellvorstellung, daß bei hochfrequenter Änderung auf Hin- und Rückweg vor allem die Feder beteiligt ist; für plastische Veränderungen bleibt zuwenig Zeit. Die Autoren diskutieren als Erklärung für den anfänglich steilen Dehnungsverlauf einen kurzfristigen "shear thinning"-Effekt, der nach länger andauernder Deformation bei der monophasischen Entspannung nicht mehr zur Verfügung steht. Nach Fig.17 der genannten Arbeit verlaufen Dehnung und Entspannung gleich, wenn der Ansaugdruck nicht länger als 2 sec bestehen bleibt. Hält die Deformation länger an, ist der Verlauf des "recovery" verzögert. Wenn das "shear thinning" für den biphasischen Deformationsverlauf verantwortlich sein soll, muß es für mindestens 2 sec bestehen bleiben, um während der dann unmittelbar folgenden "recovery"-Phase noch wirksam sein zu können.

Dem widerspricht aber die Feststellung der zitierten Autoren selbst, daß die schnelle Deformationsphase "considerably shorter than 1 sec" ist. Der "shear thinning"-Effekt müßte dementsprechend nach deutlich weniger als 2 sec unwirksam sein. Er kann, wie bereits festgestellt, während des "recovery" nicht selbständig einsetzen (monophasischer Verlauf!). Das oben angeführte mechanische Modell der viskoelastischen Membran erscheint zur Erklärung des biphasischen Verhaltens daher besser geeignet. Weiterhin genügt es der Abhängigkeit der hämolytischen Wirkung tangentialer Scherkräfte von der Expositionszeit: die Anzahl Hämoglobin-durchlässiger Poren nimmt mit der Expositionszeit zu, da eine plastische Umordnung der Membranbestandteile für deren Entstehung erforderlich ist.

Differenzierung visköser und elastischer Eigenschaften

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten legen die Vermutung nahe, daß die untersuchten Pharmaka auf visköse und elastische Eigenschaften der Erythrozytenmembran nicht gleich wirken. Unterschiede können sich dann zeigen, wenn tangentiale mechanische Belastungen der Membran für stark differierende Zeiten gesetzt werden.

Die Expositionszeit bei der Scherkraftmethode liegt im Mikrosekunden-Bereich. Bei der osmotischen Hämolyse dagegen ist die Dauer der tangenialen Membrandehnung um etwa den Faktor 10^7 größer. Yee et al. (79) zeigten eine exponentielle Abnahme intrazellulären Hämoglobins in Abhängigkeit von der Expositionsdauer in 125 milliosmolarem Medium. Dies entspricht einer Reaktion erster Ordnung. Die Fraktion der letztendlich hämolysierenden Zellen wird dabei gleich 100% gesetzt. Die Halbwertszeit der Hämoglobinfreigabe betrug in der genannten Untersuchung 14 sec. Nachdem die gezeigten Daten in halb-

logarithmischer Auftragung gute Anpassung einer Geraden zuließen, welche extrapoliert auf die Zeit t=0 den Ausgangswert von 100% intrazellulärem Hämoglobin ergibt (vgl. Fig.5 der zitierten Arbeit), hämolysieren die ersten Zellen praktisch unmittelbar nach der Exposition mit hypotonem Medium. Daraus ist zu schließen, daß der Übergang vom Diskozyten zum Sphärozyten relativ schnell vor sich geht, die tangentiale Dehnung aber Zeiten benötigt, die in der Größenordnung von 14 sec liegen.

Für eine plastische Umformung der Erythrozytenmembran bleibt daher bei der osmotischen Hämolyse 10^7-mal mehr Zeit als bei der Scherkraftmethode. Somit werden mit ersterer Methode vorwiegend Änderungen der plastischen Membraneigenschaften erkannt werden können, während das andere Verfahren hauptsächlich gegen Einflüsse auf das elastische Membranverhalten empfindlich ist. Die Desorptionsmethode wird aus den gleichen Zeitgründen ebenfalls auf visköse Eigenschaften ansprechen, wenn die tangentialen Kräfte hierfür überhaupt ausreichen.

Die Expositionszeit bei der Ultraschallmethode ist vorwiegend durch die Implosionsdauer der erzeugten Kavitationen gegeben und daher eher im Mikrosekundenbereich oder darunter zu suchen. Aus bereits besprochenen Gründen wurde kein Einfluß der untersuchten Pharmaka auf die Ultraschall-Fragilität gefunden. Die vorgestellte Ultraschall-Methodik eignet sich daher nicht zur Differenzierung visköser und elastischer Membraneigenschaften. Dennoch könnte Ultraschall hierzu grundsätzlich gut geeignet sein, da sich die Frequenz genügend frei wählen läßt. Für die Abhängigkeit der Expositionsdauer von der Ultraschallfrequenz ist aber eine kavitationsfreie Beschallung zu fordern, bei der z.B. in der Nähe vibrierender Gasbläschen Scherkräfte durch Mikroströmungen auftreten. Einen hierzu geeigneten Versuchsaufbau beschreiben z.B. Williams et al. (78) und Rooney (55). Der Einfluß wiederholter Scherkraftexposition auf die Frage, ob visköse oder elastische Eigenschaften gemessen werden, muß noch geklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Expositionsdauer zu beeinflussen, besteht in der Variation der Viskosität des extrazellulären Mediums. Die tangentiale Membranbelastung wird dadurch erhöht (vgl. oben); gleichzeitig verlängert sich wegen des verzögerten Durchflusses die Aufenthaltsdauer eines Erythrozyten im Filterporenkanal.

Bei der Filtrationsmethode war ab 0.1 millimolarer Chlorpromazinkonzentration eine deutliche Fragilitätserhöhung im isotonen Medium zu beobachten, in hypotoner Suspension bereits ab $5*10^{-5}$ M. Schwache stabilisierende Effekte von bis zu 4% in hypotoner, 5 bis 20 mikromolarer Chlorpromazinlösung befanden sich an der Grenze des 5%-Signifikanzniveaus. Bei der osmotischen Hämolyse werden aber wesentlich höhere stabilisierende Effekte dieses Wirkstoffs gefunden.

Hieraus läßt sich schließen, daß der protektive Chlorpromazineffekt vor allem plastische Membraneigenschaften betrifft. Festzuhalten bleibt allerdings, daß destabilisierende Wirkstoffkonzentrationen auch bei der Scherkraftmethode deutliche Effekte zeigten. Eine Zuordnung des destabilisierenden Effekts zu elastischen oder viskösen Membraneigenschaften ist somit nicht möglich.

Chlorpromazin-Methojodid, SDS und Thiazinamium hatten keinerlei Einfluß auf die Fragilität; letztere zwei wirkten bei der Scherkraftmethode nur aufgrund chemischer Hämolyse ab 50 µM bzw. 5 bis 10 µM. Na-Thiopental zeigte geringe stabilisierende Effekte bis 7%.

Mechanismen des protektiven Effekts

a) aktive Membranexpansion

Seeman und Mitautoren bieten als Erklärung für die protektive Wirkung von Anästhetika gegen osmotische Hämolyse einen aktiv membranexpandierenden Effekt dieser Pharmaka (61-66). Die Volumenexpansion der Membran betrage etwa das zehnfache des Van der Waal-Volumens der in die Membranphase eindiffundierenden Moleküle. Dies wurde berechnet aus der zweiprozentigen Oberflächenzunahme unter der Annahme einer gleichen Schwellung in alle drei Dimensionen. Als molekularer bzw. physikalischer Hintergrund einer solchen Expansion stehen u.a. Konformationsänderungen der Membranproteine und Fettsäureketten bzw. Änderungen der Oberflächenspannung (Membran-Wasser) zur Diskussion.

Für lipidlösliche, also membrangängige Inhalationsanästhetika wie Äther, Halothan und Methoxyfluran ist der antihämolytische Effekt näher beschrieben bei Seeman et al. (66) sowie mit Hilfe einer Mikropipetten-Aspirationstechnik direkt gemessen bei Brailsford (8). Letzterer beschrieb eine Vergrößerung der aspirierten Zellfraktion z.B. nach Halothangabe innerhalb von 5 sec. Vollständig reversibel war dieser Vorgang aber selbst nach 20 min nicht. Osmotisch verursachte Änderungen des Zellvolumens wurden durch vergleichende Hämatokrit-Bestimmungen ausgeschlossen.

Trudell (73, 74) stellt vor allem den behaupteten Volumenzuwachs als zu groß in Frage, den Seeman aus dem Oberflächenzuwachs, erhoben zur Potenz 3/2, errechnet. Anstelle einer nicht beweisbaren Expansion in alle drei Dimensionen sei vielmehr der Flächenzuwachs begleitet von einer Abnahme der Dicke der Membran infolge einer Konformationsänderung von Fettsäureketten. Die in der Einleitung bereits zitierten Resultate von Mori et al. (48) mit Phospholipidvesikeln in wässriger Suspension erklären nur eine Expansion um etwa das 1.1-fache des Volumens der in die Membranphase eindiffundierenden Moleküle.

Der von Seeman postulierte Faktor 10 sollte angezweifelt werden, da dieses Mehr an Volumenexpansion mit Konformationsänderungen auf molekularer Ebene bzw. Wassereinlagerung in die Membran begründet werden müßte. In der Übersichtsarbeit von Seeman wurde nicht erklärt, woher die Energie (Überwindung der Van der Waalschen Kräfte!) für diesen Vorgang stammen soll. Als weiteres Gegenargument sei nochmals an die Aussage von Conrad et al. (19, 20), Bondy et al. (6) und Leterrier et al. (43) erinnert, wonach die tatsächliche Löslichkeit amphiphiler Moleküle in den meisten Biomembranen um ca. 3 Zehnerpotenzen kleiner sei als in Phospholipidvesikeln. Wenn Chlorpromazin und andere amphiphile Pharmaka deutlich weniger in die unbelastete Membran eindringen können, als von Seeman und Mitautoren angenommen, muß der oben beschriebenen Vorstellung von Trudell der Vorzug gegeben werden.

b) Oberflächeneffekte

Conrad et al. (19, 20) nehmen an, daß die an der Membran-Wasser-Grenzfläche bestehende Oberflächenspannung die Erythrozytenmembran in einen "komprimierten Zustand" versetzt. Na-dodecyl-sulfat und die Phenothiazine Chlorpromazin, Chlorpromazin-Methojodid und Thiazinamium sind grenzflächenaktiv. Eine durch diese Pharmaka verursachte Verringerung der Oberflächenspannung könnte für den Oberflächenzuwachs verantwortlich sein.

c) Vergrößerung der Expansibilität

Es fehlen direkte Beweise für die Annahme, daß die Oberflächenexpansion unmittelbar nach Wirkstoffzusatz, d.h. ohne tangentiale mechanische Belastung eintritt. Insbesondere erscheinen die häufig benutzten elektronischen Zellvolumen-Messungen (Coulter Counter), mit deren Hilfe Membranoberflächen errechnet werden, wegen des Einflusses pharmakoninduzierter Oberflächenänderungen (7, 21, 47, 67) problematisch (68, 79). Rheologische Messungen erbringen ebenfalls keinen Anhalt für aktive Membranexpansion (9, 14, 54).

Es muß daher die Möglichkeit diskutiert werden, daß die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pharmaka vor allem die passive Dehnbarkeit der Membran beeinflussen, bzw. die Entstehung hämoglobindurchlässiger Membranlecks verzögern, ohne nennenswert in die mechanisch unbelastete Membran einzudringen. Danach würden die Wirkstoffmoleküle zunächst an der extrazellulären Oberfläche adsorbiert, wobei der polare Teil die wässrige Phase nicht verläßt. Erst nach tangentialer Dehnung geht der hydrophobe Molekülteil in die Lipidphase der Membran und verbessert so den tangentialen Zusammenhalt bzw. verstopft sonst evtl. entstehende Poren. Einen ähnlichen Mechanismus beschreiben Zografi et al. (80) für künstliche Membranen.

Die Diffusion der Wirkstoffmoleküle in die Membranlipidphase erfordert eine gewisse Zeit, die bei der osmotischen Hämolyse sicherlich ausreichend vorhanden ist. Geht man nun davon aus, daß die Wirkstoffmoleküle sich zunächst nur an der Membran/Wasser-Grenzfläche verteilen, so hat Chlorpromazin Zeit in der Größenordnung von Sekunden, seine protektive Wirkung zu entfalten. Nachdem aber bei der Scherkraftmethode nur etwa 2 µsec Zeit zur Positionsänderung von CPZ und dessen Bindungsstellen bleiben, erscheint der relativ geringe stabilisierende Effekt verständlich, der in diesen Versuchen erzielt wurde. Erwartungsgemäß hat dann auch das quarternäre Analogon CPZ-MJ keinen nachweisbaren Effekt, da es aufgrund seiner deutlich geringeren Lipophilie wesentlich langsamer in die Membranphase diffundieren kann. Gleiches gilt für das quarternäre Thiazinamium, mit dem ebenfalls kein protektiver Effekt beobachtet wurde. Die lipophileren Verbindungen Na-dodecylsulfat und Natrium-Thiopental hatten wiederum geringe stabilisierende Wirkungen in der Größenordnung des Chlorpromazins.

Die Vorstellung von der Adsorption der Wirkstoffmoleküle an der Membran/Wasser-Grenzfläche steht im Einklang mit den beschriebenen Zeiteffekten. Die zu beobachtenden protektiven Effekte werden kleiner bei kürzerer tangentialer Belastung und bei kleineren Diffusionskonstanten von weniger lipophilen Agentien. Ein primär membranexpandierendes Pharmakon müßte seine Wirkung aber bei kurzer Belastung genauso entfalten, da es sich bereits an seinem Wirkort befände.

Aktive oder passive Expansion?

Stabilisiert das Pharmakon durch primäre Eindiffusion in die Membranphase oder steht es bereit, adsorbiert an die Membranoberfläche und teilweise in der wässrigen Phase befindlich, wenn tangentiale Kräfte die Membran belasten?

Die bisher genannten Daten lassen vermuten, daß der Eintritt von Wirkstoffmolekülen erst erfolgt, wenn die Membran gedehnt ist. Dabei kann sie bis zu 8% Oberfläche (4% tangential) zunehmen, bevor sie rupturiert (10, 11, 26). Es ist leicht vorstellbar, daß eine solche mechanische Zustandsänderung von einer Strukturänderung der Membranbestandteile begleitet ist. Dieser Vorgang ist von den viskösen Eigenschaften der Erythrozytenmembran abhängig; er erfordert eine gewisse Zeit. Die Umstrukturierung kann Bindungsstellen für das Pharmakon bereitstellen. Dieses wird durch sein Eintauchen in die Membran die Rupturierung verzögern und somit weitere Dehnung ohne Hämolyse ermöglichen.

Zur Entscheidung zwischen primärer und sekundärer Membranexpansion wurden die Versuche nach der Desorptionsmethode durchgeführt. Wie erwartet, war diese Methode sehr empfindlich gegen geringe Schwankungen des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses. Dies beweist der steile Anstieg des Anteils der auf der Filteroberfläche retinierten Erythrozyten bei abnehmender Osmolarität des Suspensionsmediums. Im NaCl-Konzentrationsbereich von 0.6 bis 0.46 g% steigt dieser Prozentsatz von etwa 10% bis auf 90%. Daß bis zu 90% der Zellen retiniert werden konnten, beweist weiterhin, daß die dank Verwendung eines Zwischenfilters reduzierte Sogwirkung keine relevante tangentiale Belastung der Membran verursacht. Die fehlenden 10% beim Maximum der Retention können auch durch Überlagerung mit gerade einsetzender osmotischer Hämolyse erklärt werden.

Wenn ein Pharmakon primär, also ohne gleichzeitige tangentiale Belastung, die Erythrozytenmembran expandiert, so muß eine deutliche Verschiebung dieses ansteigenden Schenkels nach hypoton erfolgen. Abb.23 und 24 zeigen für eine mit 25 μmolarer CPZ-Lösung inkubierte Population das genaue Gegenteil, nämlich eine Passagebehinderung um bis zu 33%. Diese kann wohl nur auf die bekannten Formveränderungen (vgl. oben) durch dieses bei pH 7.4 zu 50% in kationischer Form (63, Fig.5) vorliegende Agens zurückgeführt werden. Zum Beleg dient die reduzierte Passagefähigkeit von Erythrozyten in einer Lösung von 2 mg/ml Albumin (Abb.28). In dieser Konzentration bilden sich Stomatozyten (Remien, unveröffentlichte Daten, Walther Straub Inst. für Pharmakologie und Toxikologie, München). Diese sind schlechter verformbar als die normalen Diskozyten. Eine membranexpandierende Wirkung von Albumin kann mangels Diffusionsfähigkeit in die Membran ausgeschlossen werden.

Allerdings zeigt Abb.23 auch drei mit $2*10^{-5}$ molarer Chlorpromazinlösung inkubierte Populationen, die in 0.5-prozentiger NaCl-Lösung eine verbesserte Passagefähigkeit von im Mittel 12% gegenüber der Kontrolle ohne Pharmakon aufweisen. Dieser Effekt liegt im erwarteten Bereich, wenn man einen "NaCl-Shift" von 0.02 g% durch Chlorpromazin (entsprechend etwa 25% antihämolytischem Effekt; Remien, unveröffentlichte Daten, Anschr. s.o.) anwendet auf die Steilheit des nach hypoton ansteigenden Schenkels in Abb.22, welcher auf Änderungen des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses anspricht.

Diese Passageverbesserung kann aber wiederum mit Formeffekten erklärt werden. Vom Waschen der Erythrozyten bis zur Filterpassage ist teilweise eine (leider nicht genau registrierte) Aufbewahrungszeit in glukosefreiem Puffer in der Größenordnung von einigen Stunden vergangen. Dies führt zur Bildung von Echinozyten (23), ein Vorgang, der durch Chlorpromazin in der angewandten Konzentration antagonisiert wird; vgl. hierzu die bereits genannten Literaturstellen über Formveränderungen. Es ist daher nicht auszuschließen, daß in der einen Population Diskozyten in schlechter passagefähige Stomatozyten übergingen, während bei den anderen drei die ungünstige Echinozytenform zur besser porengängigen Diskozytenform revertiert wurde.

Weitere Hinweise gegen primäre Membranexpansion zeigt Abb.25. Mit variabler Chlorpromazinkonzentration und fixem Kochsalzgehalt von 0.5 g% konnte in Richtung auf die maximal antihämolytische CPZ-Konzentration von $2*10^{-5}$ mol/l keine fallende Tendenz der retinierten Zellen und damit keine Verbesserung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses entdeckt werden. Wiederholung mit 0.46 g% NaCl, also unter gerade einsetzender Hämolyse, erbrachte die erwartete erhöhte Retention infolge jetzt erst darstellbaren antihämolytischen Effekts. Für die erhöhte Retention bis fast 70% (gegenüber Kontrolle ohne Pharmakon) in Abb.25 bei $4*10^{-5}$ M CPZ kommen die bereits diskutierten Formeffekte als Ursache in Frage.

Ein ähnliches Verhalten wies das quarternäre Phenothiazin Thiazinamium auf. Abb.26 (variable Kochsalzkonzentration) zeigt verbessertes Passageverhalten unter 1 millimolarem Thiazinamium mit Maximum bei 0.46 g% NaCl. Hier waren die Effekte mit 30% bis 50% weniger Retention sogar noch höher. Die Versuche mit fixer NaCl-Konzentration von 0.5 g% und variablem Thiazinamium ließen keine eindeutige Tendenz in Richtung auf maximal antihämolytische Konzentration erkennen (Abb.27).

Die Ergebnisse der Desorptionsmethode zeigen also ein vergleichbares Verhalten einer quarternären und einer zu 50% in tertiärer Form vorliegenden Verbindung. Das quarternäre Molekül vollbrachte sogar bei Untersuchung mit variabler Ionenstärke eine größere Verbesserung der Passagefähigkeit. Das Modell der primären Membranexpansion erfordert jedoch die Diffusion der Wirkstoffmoleküle in die Membranphase. Es ist nicht einzusehen, daß das schlechter lipidlösliche Molekül dieses möglicherweise sogar noch besser können soll. Die Verbesserung des Passageverhaltens mit 20 μM CPZ und 0.5-prozentiger Kochsalzlösung wird daher besser mit Formeffekten als mit primärer Membranexpansion erklärt.

Einfluß der Aufbewahrungsdauer

Erythrozyten aus überalterten, im Kühlschrank aufbewahrten ACD-Konserven wiesen eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegen Scherkräfte auf als frisch gespendete (Abb.10). Weiterhin wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung auch alterungsbedingte Änderungen der mechanischen Fragilität in verschieden osmolaren Medien registriert. Im Ergebnisteil sind die Beobachtungen an einer ACD-Konserve über 18 Tage und an gewaschenen Erythrozyten über 3 Tage beschrieben. Parameter für die Empfindlichkeit von Erythrozyten gegen Hypotonizität ist die Steilheit der Hämoglobinfreigabe in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums. Es fiel bei Konservenblut eine zunehmende Empfindlichkeit der Zellen während 14 Tagen auf, die aber am 18. Tag unter den Ausgangswert sank. Die gewaschenen Erythrozyten zeigten während der dreitä-

gigen Aufbewahrung im Kühlschrank eher eine (nicht signifikante) Empfindlichkeitsabnahme. Der Einfluß auf die Empfindlichkeit stellt sich sowohl hinsichtlich der Steilheit der Osmolaritätsabhängigkeit wie auch des Absolutbetrages intrazellulären Hämoglobins dar (Abb.12 und 13). Unter isotoner Bedingung zeigt sich praktisch keine altersbedingte Änderung. Die Aufbewahrung von Frisch- und Konservenblut erfolgte bei ca. 5°C.

Als Erklärung für dieses Verhalten werden in der Literatur vor allem zwei Mechanismen gefunden. Haradin et al. (31) beschreiben einen etwa exponentiellen Verlust von Cholesterin und Phospholipiden während gekühlter Aufbewahrung von ACD-Blut. Nach Fig.2 dieser Arbeit beträgt er nach 7 Tagen etwa 10%, nach 14 Tagen knapp 20%. Dieser Vorgang muß zu einer Destabilisierung der Membran gegenüber mechanischen Belastungen führen.

Weiterhin ist bekannt, daß der Hämoglobingehalt des Erythrozyten im Lauf der Alterung zunimmt. Bartosz et al. (2) führen dies in der Hauptsache auf Elektrolytverschiebungen zurück. Dabei sei der Kalium-Ausstrom höher als der Natrium-Einstrom. Eine solche negative Elektrolyt-Bilanz muß von osmotischem H_2O-Verlust gefolgt sein. Es ist verständlich, daß die Zellen dann gegenüber abnehmender Tonizität des Suspensionsmediums eine größere Reserve besitzen.

Die eigenen Daten zeigen wohl eine Überlagerung beider Mechanismen beim ACD-Blut (Abb.12). Demnach muß bis zum 5. Aufbewahrungstag der Lipidverlust im Vordergrund stehen und die Empfindlichkeit der Zellen erhöhen. Zwischen 5. und 14. Tag heben sich beide Effekte auf, während nach 18 Tagen gekühlter Aufbewahrung des ACD-Blutes die "osmotische Reserve" überwiegt und die Population unempfindlicher macht.

Während das ACD-Blut bereits nach 5 Tagen die beschriebene deutliche Destabilisierung zeigt, weisen gewaschene, im Kühlschrank in PBS-Puffer aufbewahrte Erythrozyten im Verlauf dreitägiger Beobachtung eine schwache Stabilisierung auf. Dies paßt gut zur obigen These, denn im Gegensatz zur ACD-Konserve besitzt der Puffer keine Plasmaproteine, welche die Membranlipide aufnehmen könnten. Der so bestehende, für den Übergang in die wässrige Phase ungünstige Verteilungskoeffizient "stabilisiert" demgemäß die Membran. Die in Abb.13 dargestellte Stabilisierung innerhalb von 3 Tagen ist nur gering. Dieser Umstand wird aber verständlich, wenn man bedenkt, daß das Prinzip der "osmotischen Reserve" offensichtlich später einsetzt (sichtbar nach etwa 14 Tagen), wie aus dem biphasischen Verhalten der ACD-Erythrozyten hervorgeht.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorgelegten Arbeit wird der Einfluß amphiphiler Pharmaka auf die mechanische Belastbarkeit und Verformbarkeit von Erythrozyten gesunder Spender untersucht. Zur mechanischen Belastung wurden Erythrozytensuspensionen Scherkräften in engen Kanälen oder Ultraschall ausgesetzt. Die Verformbarkeit wurde anhand der Filtrierbarkeit von Suspensionen niedrigen Hämatokrits bestimmt.

Mit der Ultraschallmethodik konnten keine Wirkungen der untersuchten Pharmaka auf die Fragilität nachgewiesen werden. Gegen Scherkräfte erbringen Phenothiazine mit tertiärem Stickstoff geringe, solche mit quarternärem keine Stabilisierung. Mit Na-dodecylsulfat war ebenfalls kein Einfluß nachweisbar, Thiopental stabilisierte in geringem Umfang. Effekte auf die Verformbarkeit von Erythrozyten waren nicht eindeutig. Angesichts der deutlichen antihämolytischen Wirksamkeit dieser Substanzen erscheinen solche Ergebnisse zunächst erstaunlich. Zur Interpretation dieses scheinbaren Widerspruchs wird ein Membranmodell vorgestellt, das zwischen viskösen und elastischen Eigenschaften der Membran differenziert.

Eine solche Differenzierung liefert ein wichtiges Argument gegen eine primär membranexpandierende Wirkung der Phenothiazine. Diese können ihren protektiven Effekt erst dann entfalten, wenn nach plastischer Umformung der Erythrozytenmembran Bindungsstellen frei geworden sind, die die Wirkstoffmoleküle aufnehmen. Würde der Wirkstoff primär, also ohne vorangegangene mechanische Belastung in die Membranphase eindiffundieren, müßte sein protektiver Effekt unabhängig davon sein, wie lange die Noxe andauert; es bräuchte keine plastische Umformung. Somit ist die Vorstellung begründet, daß Phenothiazine wie Chlorpromazin an der Membran-Wasser-Grenzfläche adsorbiert sind und dadurch die Expansibilität der Erythrozytenmembran vergrößern, ohne sie a priori zu expandieren. Der antihämolytische Effekt von Phenothiazinen wird der viskösen Komponente zugeordnet. Dies läßt sich damit begründen, daß die pharmakoninduzierte Stabilisierung der Membran bei kurzdauernder Belastung durch Scherkräfte im Mikrosekundenbereich gering ist oder ganz ausbleibt. Die Stabilisierung gegen osmotische Hämolyse ist dagegen deutlich größer. Hier liegt die Dauer der tangentialen Membranbelastung in der Größenordnung von 10 sec; sie hält also um den Faktor 10^7 länger an, als bei der Scherkraftmethode.

Erythrozyten veränderten ihre Empfindlichkeit gegen Scherkräfte während der Aufbewahrung in einer ACD-Konserve bei einer Temperatur von ca. 5°C. Die Empfindlichkeit nahm in der ersten Woche zu und sank in der dritten unter das Ausgangsniveau ab. Nach 3 Monaten war die Empfindlichkeit deutlich größer

als zu Beginn. Dagegen wiesen frisch gespendete, gewaschene und in Puffer suspendierte Erythrozyten ausschließlich eine Abnahme der Empfindlichkeit gegen Scherkräfte während dreitägiger Beobachtung auf. Die Stabilisierung kann in beiden Fällen mit Elektrolyt- und H_2O-Verschiebung nach extrazellulär erklärt werden, wodurch sich ein günstigeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Zellen einstellt. Für die vorübergehende Destabilisierung bei ACD-Erythrozyten sind wahrscheinlich Lipidverluste aus der Membran an die Plasmaproteine verantwortlich.

Bei der Hämoglobinfreisetzung durch Ultraschall bzw. Scherkräfte wurde eine exponentielle Abhängigkeit von Beschallungszeit bzw. Filtrationsdruck beobachtet. Im Anhang sind Basic-Programme zur Kurvenanpassung an einfache und doppelte (d.h. Summe aus zwei einfachen) e-Funktionen sowie zur statistischen Auswertung vorgestellt. Sie geben Entscheidungshilfen zur Annahme von Ein- oder Zwei-Kompartiment-Modellen. Bei der Ultraschallmethode war mit allen Pharmaka die Anpassung einer einfachen e-Funktion an die Meßdaten möglich. Dies steht in Einklang zu einer Zellzerstörung durch implodierende Kavitationen unter hoher Energiefreisetzung nach dem "Alles-Oder-Nichts"-Prinzip. Die protektive Wirkung erhöhter extrazellulärer Viskosität und der Verlauf der Meßdaten entlang einer doppelten e-Funktion werden als Folge einer Strömungsbehinderung erklärt.

Bei der Untersuchung des Effekts von Scherkräften im Filterporenkanal erbringen die Daten signifikante Parameter für Ein- und Zwei-Kompartiment-Modelle; für letztere bevorzugt dann, wenn Erythrozyten durch Altern, hypotones Suspensionsmedium oder destabilisierende Wirkstoffkonzentrationen empfindlicher geworden sind. Dies kann zum einen bedeuten, daß die Fraktion besonders fragiler Erythrozyten größer geworden ist, so daß deren Existenz als eigene Subpopulation statistisch nachgewiesen werden kann. Zum anderen muß aber auch erwogen werden, daß die etwa 10% Doppelporen im Filtermaterial die eingesetzte Erythrozyten-Gesamtpopulation, deren Individuen sich nicht a priori unterscheiden, in zwei verschieden stark geschädigte Fraktionen aufspalten. Als Alternative zum Zwei-Kompartiment-Modell wurde schließlich noch eine mathematische Beziehung für die Hämolyse im Filterkanal als Funktion des Filtrationsdrucks formuliert, wobei eine lineare Abhängigkeit des Halbwertsdrucks von der Expositionszeit berücksichtigt ist.

Zur weiteren Aufklärung der besprochenen Abhängigkeit des stabilisierenden Effekts von der Dauer der mechanischen Belastung müßte diese gezielt verändert werden, z.B. mit Ultraschall verschiedener Frequenzen. Außerdem kann man die Expositionsdauer durch erhöhte extrazelluläre Viskosität verlängern. Zu fordern wäre eine kavitationsfreie Beschallung, bei der Scherkräfte durch Mikroströmungen auftreten. Kavitationen setzen hohe Energien frei, diese zerstören Erythrozyten nach dem "Alles-Oder-Nichts"-Prinzip. Veränderungen der Membraneigenschaften können so nicht gesehen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Bacher R P & Williams M C (1970) Hemolysis in capillary flow. J Lab Clin Med **76**, 485-96.

2. Bartosz G & Leyko W (1980) Aging of the erythrocyte. I. Increase in the microviscosity of cell interior as determined by the spin label method. Blut **41**, 131-6.

3. Bessis M & Mohandas N (1975) Deformability of normal, shape-altered and pathological red cells. Blood Cells **1**, 315-21.

4. Birchmeier W & Singer S J (1977) On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. II. The role of ATP. J Cell Biol **73**, 647-59.

5. Bodemann H & Passow H (1972) Factors controlling the resealing of the membrane of human erythrocyte ghosts after hypotonic hemolysis. J Membrane Biol **8**, 1-26.

6. Bondy B & Remien J (1981) Differential binding of chlorpromazine to human blood cells: application of the hygroscopic desorption method. Life Sci **28**, 441-9.

7. Braasch D & Rogausch H (1971) Decreased red cell deformability after severe burns, determined with the chlorpromazine test. Pflügers Arch **323**, 41-9.

8. Brailsford J D Bull M H & Bull B S (1980) Direct measurement of erythrocyte membrane expansion due to gaseous anesthetics. In: Molecular mechanisms of anesthesia. Ed. by Fink B R. Progr Anesthesiol **2**, 379-83.

9. Bruijne A W de & Steveninck J van (1979) The effect of anesthetics and heat treatment on deformability and osmotic fragility of red blood cells. Biochem Pharmacol **28**, 177-82.

10. Bull B S (1972) Red cell biconcavity and deformability. A macromodel based on flow chamber observations. Nouv Rev Fr Hematol **12**, 835-44.

11. Bull B S & Brailsford J D (1973) The biconcavity of the red cell: an analysis of several hypotheses. Blood **41**, 833-44.

12. Bull M H Brailsford J D & Bull B S (1982) Erythrocyte membrane expansion due to the volatile anesthetics, the 1-alkanols, and benzyl alcohol. Anesthesiology **57**, 399-403.

13. Burton A C (1966) Role of geometry, of size and shape, in the microcirculation. Fed Proc **25**, 1753-60.

14. Chen R Y Z Lee M M L & Chien S (1979) Local anesthetics and the rheologic behavior of erythrocyte suspensions. Anesthesiology **51**, 245-50.

15. Chien S Luse S A & Bryant C A (1971) Hemolysis during filtration through micropores: a scanning electron microscopic and hemorheologic correlation. Microvasc Res **3**, 183-203.

16. Chien S Sung K-L P Skalak R Usami S Tözeren A (1978) Theoretical and experimental studies on viscoelastic properties of erythrocyte membrane. Biophys J **24**, 463-87.

17. Chien S Usami S Dellenback R J & Gregersen M I (1967) Blood viscosity: Influence of erythrocyte deformation. Science **157**, 827-9.

18. Chien S Usami S Jan K-M & Skalak R (1973) Macrorheological and microrheological correlation of blood flow in the macrocirculation and microcirculation. In: Rheology of biological systems, pp 12-48. Ed. by Gabelnick H L & Litt M. Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois.

19. Conrad M J & Singer S J (1979) Solubility of amphipathic molecules in biological membranes and lipid bilayers and its implications for membrane structure. Proc Natl Acad Sci **76**, No 10, 5202-6.

20. Conrad M J & Singer S J (1981) The solubility of amphipathic molecules in biological membranes and lipid bilayers and its implications for membrane structure. Biochemistry **20**, No 4, 808-18.

21. Deuticke B (1968) Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes. Biochim Biophys Acta **163**, 494-500.

22. Evans E & Fung Y C (1972) Improved measurements of the erythrocytes geometry. Microvasc Res **4**, 335-47.

23. Feo C & Mohandas N (1977) Role of ATP depletion on red cell shape and deformability. Blood Cells **3**, 153-61.

24. Fisz M (1970) Wahrscheinlichkeitsrechnung und mathematische Statistik. **5.** Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften. Berlin (DDR).

25. Forth W Henschler D Rummel W (Hrsg) (1980) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. **3.** Aufl, Bibliographisches Inst Mannheim Wien Zürich, Wissenschaftsverlag.

26. Fung Y C (1977) Red blood cells and their deformability. In: Microcirculation, Vol **I**, 255-78.

27. Geigy AG (1968) Documenta Geigy Wissenschaftliche Tabellen. **7.** Aufl, 1. revidierter Nachdruck 1969, J R Geigy AG, Basel.

28. Gerthsen C & Kneser H O (1969) Physik. **10.** Aufl, Springer Berlin Heidelberg New York.

29. Goodman Gilman A Goodman L S Gilman A (Ed) (1980) The pharmacological basis of therapeutics. 6th edition, Macmillan Publishing Co New York.

30. Halpern B N & Bessis M (1950) Action anti-sphérocytaire de certains corps synthétiques dérivés de la phénothiazine. C R Seances Soc Biol **144**, 759-60.

31. Haradin A R Weed R I & Reed C F (1969) Changes in physical properties of stored erythrocytes. Relationship to survival in vivo. Transfusion **9**, No 5, 229-37.

32. Harrison D G & Long C (1968) The calcium content of human erythrocytes. J Physiol **199**, 367-81.

33. Hughes D E & Nyborg W L (1962) Cell disruption by ultrasound. Science **138**, 108-14.

34. Johannsson P W Jay A W & Rowlands S (1977) Electronic measurement of red cell flow in micropipettes. Can J Physiol Pharmacol **55**, 72-6.

35. Johnson R M & Kirkwood D H (1978) Loss of resealing ability in erythrocyte membranes. Effect of divalent cations and spectrin release. Biochim Biophys Acta **509**, 58-66.

36. Kaboth W & Begemann H (1971) Blut. In: Gauer Kramer Jung (Hrsg), Physiologie des Menschen. Band 5. Urban & Schwarzenberg, München.

37. Keshavia J M S (1970) Thesis. University of Minnesota, Minneapolis.

38. Klimmek R Szinicz L & Weger N (1983) Chemische Gifte und Kampfstoffe. Hippokrates Verlag Stuttgart.

39. Krüger-Thiemer E & Schlender B (1963) Die Lösung chemotherapeutischer Probleme durch programmgesteuerte Ziffernrechenautomaten. 2. Mitteilung: Die exakte Berechnung der Gleichungsparameter und ihrer Vertrauensgrenzen mit Hilfe des Gauss-Newton-Iterationsverfahrens. Arzneimittelforschung **13**, 891-4.

40. Krüger-Thiemer E Schlender B & Seydel J (1963b) Die Lösung chemotherapeutischer Probleme durch programmgesteuerte Ziffernrechenautomaten. 3. Mitteilung: Die Berechnung der Basallöslichkeit S_0 und der sauren pKá-Werte von Sulfonamiden nach der Löslichkeitsgleichung von Krebs und Speakman. Arzneimittelforschung **13**, 894-906.

41. Kwant W O & Seeman P (1969) The membrane concentration of a local anesthetic (chlorpromazine). Biochim Biophys Acta **183**, 530-43.

42. Kwant W O & Steveninck J van (1968) The influence of chlorpromazine on human erythrocytes. Biochem Pharmacol **17**, 2215-23.

43. Leterrier F Mendyk A & Viret J (1976) Interaction of chlorpromazine with biological membranes. A photochemical study using spin labels. Biochem Pharmacol **25** II, 2469-74.

44. Leverett L B Hellums J D Alfrey C P & Lynch E C (1972) Red blood cell damage by shear stress. Biophys J **12**, 257.

45. List P H Hörhammer L Roth H J & Schmid W (Hrsg) (1977) Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. **4.** Ausg, Springer Berlin Heidelberg New York.

46. Marchesi S L Steers E Marchesi V T & Tillack T W (1969) Biochemistry **9**, 50-7.

47. Mohandas N & Feo C (1975) A quantitative study of the red cell shape changes produced by anionic and cationic derivatives of phenothiazine. Blood Cells **1**, 375-84.

48. Mori T Matubayasi N & Ueda I (1983) Membrane expansion and inhalation Anesthetics. Mean excess volume hypothesis. Mol Pharmacol **28**, 123-30.

49. Negwer M (1978) Organisch-chemische Arzneimittel und ihre Synonyma. **5.** Aufl, Akademie Verlag Berlin.

50. Nevaril C G Lynch E C Alfrey Jr C P & Hellums J D (1968) J Lab Clin Med **71**, 784.

51. Pfeffer M (1973) COMPT, a Time-Sharing Program for Nonlinear Regression Analysis of Compartimental Models of Drug Distribution. J Pharmacokin Biopharm, **1**, No.2, 137-63.

52. Ralston G B (1978) The structure of spectrin and the shape of the red blood cell. TIBS Sept 1978, 195-8.

53. Remien J & Naar R (1981) Mechanical lysis of red cells in micropores. 11th Europ Conf Microcirc, Garmisch-Partenkirchen 1980, Bibl Anat No **20**, 226-9 (Karger Basel).

54. Remien J Wissmann J (1979) Interactions of chlorpromazine, promethazine and their quarternary analogues on osmotic fragility, deformability and cell shape of human red blood cells. Microvasc Res **18** (3).

55. Rooney J A (1970) Hemolysis near an ultrasonically pulsating gas bubble. Science **169**, 869-71.

56. Sachs L (1984) Angewandte Statistik. **6.** Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.

57. Schmidt-Schönbein H (1970) Rheologische Eigenschaften von Erythrozyten. Habilitationsschrift Physiol Inst Ludwig-Maximilians-Universität München.

58. Schmidt-Schönbein H Gallasch G Gosen J v Volger E & Klose H J (1976) Red cell aggregation in blood flow. II. Effect on apparent viscosity of blood. Klin Wschr **54**, 159-67.

59. Seeman P (1966) Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquillizers. Biochem Pharmacol **15**, 1753-66.

60. Seeman P (1967) Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. J Cell Biol **32**, 55.

61. Seeman P (1969) Temperature dependence of erythrocyte membrane expansion by alcohol anesthetics. Possible Support of the partition theory of anesthesia. Biochim Biophys Acta **183**, 520-9.

62. Seeman P (1972) The membrane actions of anesthetics and tranquillizers. Pharmacol Rev **24**, 583-655.

63. Seeman P & Kwant W O (1969) Membrane expansion of the erythrocyte by both the neutral and ionized forms of chlorpromazine. Biochim Biophys Acta **183**, 512-9.

64. Seeman P Kwant W O & Sauks T (1969) Membrane expansion of erythrocyte ghosts by tranquillizers and anesthetics. Biochim Biophys Acta **183**, 499-511.

65. Seeman P Kwant W O Sauks T & Argent W (1969) Membrane expansion of intact erythrocytes by anesthetics. Biochim Biophys Acta **183**, 490-8.

66. Seeman P & Roth S (1972) General anesthetics expand cell membranes at surgical concentrations. Biochim Biophys Acta **255**, 171-7.

67. Sheetz M P & Singer S J (1974) Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. Proc Nat Acad Sci **71**, No 11, 4457-61.

68. Shrivastav B B & Burton A C (1970) The effect of changing interfacial on the shape of the red cell. Can J Physiol Pharmacol **48**, 359-68.

69. Singer S J & Garth L N (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science **175**, 720-31.

70. Solomon A K (1960) Red cell membrane structure and ion transport. J Gen Physiol **43**, Suppl. I, 1.

71. Sutera S P Mehjardi M & Mohandas N (1975) Deformation of Erythrocytes under shear. I. Rotation and deformation in dilute suspensions. Proc Roy Soc London **182** (series B), 351.

72. Tarssanen L (1976) Hemolysis by Ultrasound. Scand J Haemat, Suppl. **29**.

73. Trudell J R (1977) The membrane volume occupied by anesthetic molecules. A reinterpretation of the erythrocyte expansion data. Biochim Biophys Acta **470**, 509-10.

74. Trudell J R (1977) A unitary theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes. Anesthesiology **46**, 5-10.

75. Weast R C (Editor-in-Chief) (1973-1974) Handbook of chemistry and physics. 54th edition, Chemical Rubber Co, Cleveland (Ohio).

76. Wildenauer D B Reuther H & Remien J (1980) Reactions of the alkylating agent tris(2-chloroethyl)amine with the erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta **603**, 101-66.

77. Williams A R (1973) Viscoelasticity of the human erythrocyte membrane. Biorheology **10**, 313-9.

78. Williams A R & Hughes D E (1970) Hemolysis near a transversely oszillating wire. Science **169**, 871-3.

79. Yee J P & Mel H C (1978) Cell-membrane and rheological mechanisms: Dynamic osmotic hemolysis of human erythrocytes and repair of ghosts. Biorheology **15**, 321-39.

80. Zografi G & Auslander D E (1965) Surface activity of chlorpromazine and chlorpromazine sulfoxide in the presence of insoluble monomolecular films. J Pharmac Sci **54**, 1313-8.

ANHANG

	Seiten
Tabellen zu den Abbildungen	112 - 114
Programme	115 - 154

zu Abb. 2

sec	0	1.00	2.00	5.00	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0
% intrazell.Hb	99.9	91.4	82.4	62.0	36.0	15.1	7.35	1.84	-.854	-1.04
Quantil 25	99.7	89.8	81.4	58.7	34.0	12.5	5.06	-2.02	-.854	-6.45
Quantil 75	100.1	91.0	83.9	64.6	39.5	16.4	9.60	4.75	-.854	.330
Interquantil 50	.379	1.99	2.43	5.86	4.73	3.91	4.62	6.77	0	6.78
Fallzahl	31.0	23.0	23.0	29.0	29.0	6.00	4.00	4.00	1.00	3.00

zu Abb. 3

g% NaCl	.500	.750	1.50	2.00	3.00
Prozentdiff.	-5.24	4.4-2	10.7	25.7	30.3
t	3.32	.200	3.35	3.24	3.21
P-alpha in %	2.90	85.0	2.90	3.20	3.20

zu Abb. 4

mol/l	1.0-7	3.0-7	1.0-6	2.0-6	3.0-6	5.0-6	7.0-6	1.0-5	2.0-5	3.0-5
Prozentdiff.	1.23	4.3-2	.341	-.532	-.262	-.100	-1.66	-.910	-.020	1.40
Quantil 25	1.23	4.3-2	-.284	-.926	-.845	-1.72	-1.92	-1.36	-1.66	-1.39
Quantil 75	1.23	4.3-2	2.71	-.137	.321	.762	-1.39	1.28	2.20	2.14
Interquantil 50	0	0	3.00	.789	1.17	2.48	.530	2.64	3.86	3.53
t	0	0	.310	1.29	.430	.110	6.00	.930	1.0-2	1.07
P-alpha in %	0	0	70.0	42.0	74.0	91.0	11.0	42.0	99.0	36.0
Fallzahl	1.00	1.00	4.00	2.00	2.00	4.00	2.00	4.00	4.00	4.00

mol/l	5.0-5	7.0-5	1.0 4	2.0-4	5.0-4
Prozentdiff.	1.59	3.09	2.20	3.30	-3.06
Quantil 25	-1.33	-.204	.271	.045	-3.06
Quantil 75	4.61	7.15	5.60	6.96	-3.06
Interquantil 50	5.95	7.35	5.33	6.12	0
t	.720	1.40	1.10	1.30	0
P-alpha in %	52.0	26.0	35.0	32.0	0
Fallzahl	4.00	4.00	4.00	3.00	1.00

zu Abb. 5

mol/l	1.0-7	3.0-7	1.0-6	3.0-6	1.0-5	3.0-5	1.0-4	3.0-4	1.0 3
Prozentdiff.	-4.08	-3.76	-.298	-.143	-3.64	-3.28	-4.24	-11.9	-55.7
Quantil 25	-7.85	-3.76	-2.33	-.143	-5.95	-3.28	-4.81	-11.9	-56.0
Quantil 75	-.306	-3.76	1.74	-.143	-1.33	-3.28	-3.68	-11.9	-55.3
Interquantil 50	7.55	0	4.07	0	4.62	0	1.13	0	.790
t	1.00	0	.400	0	1.50	0	7.20	0	135.
P-alpha in %	50.0	0	94.0	0	37.0	0	9.00	0	.500
Fallzahl	2.00	1.00	2.00	1.00	2.00	1.00	2.00	1.00	2.00

zu Abb. 6

mol/l	1.0-4	2.0-4	3.0-4	5.0-4	7.0-4	1.0-3	2.0-3
Prozentdiff.	.670	-.631	.943	1.15	12.5	2.30	1.96
t	1.30	1.97	1.19	1.62	.522	2.73	2.14
P-alpha in %	24.0	12.0	30.0	10.0	64.0	5.20	9.90

zu Abb. 10: Frischblut

mm Hg	0	40.0	50.0	70.0	100.1	150.1	200.1	250.1	300.1	350.1
% intrazell.Hb	98.4	95.7	93.9	92.6	88.2	83.9	79.7	76.5	73.4	69.6
Quantil 25	97.9	94.4	93.4	91.2	87.2	83.9	78.0	74.6	72.2	69.0
Quantil 75	98.6	97.0	94.8	94.0	89.7	84.4	81.3	81.0	76.0	75.2
Interquantil 50	.677	2.60	1.33	2.78	2.42	.484	2.44	6.37	3.02	6.19
Fallzahl	17.0	2.00	5.00	2.00	17.0	5.00	17.0	3.00	10.0	3.00

mm Hg	400.1	500.1
% intrazell.Hb	69.4	62.2
Quantil 25	68.1	55.4
Quantil 75	71.9	65.3
Interquantil 50	3.81	9.92
Fallzahl	10.0	17.0

zu Abb. 10: Überalterte ACD-Konserve

mm Hg	0	30.0	40.0	50.0	70.0	100.0	200.0	300.0	400.0	500.0
% intrazell.Hb	93.9	79.3	69.8	56.9	47.5	36.1	16.2	12.0	10.6	6.22
Quantil 25	95.7	79.3	69.8	56.0	46.5	27.0	11.0	6.48	7.89	3.21
Quantil 75	97.1	79.3	69.8	60.3	48.1	36.2	24.3	17.4	13.3	10.0
Interquantil 50	1.36	0	0	4.54	1.63	9.19	12.6	11.0	5.41	7.55
Fallzahl	7.00	1.00	1.00	3.00	3.00	7.00	3.00	2.00	2.00	3.00

zu Abb. 11: indirekte Methode

milliosmol/l	240.0	260.0	280.0	300.
Prozentdiff.	-40.2	-28.6	-13.7	-0.46
Quantil 25	-49.1	-34.3	-34.6	-13.5
Quantil 75	-25.0	-23.0	-3.86	-3.41
Interquantil 50	23.3	8.50	30.7	10.1
t	4.70	13.6	1.00	1.60
P-alpha in %	1.00	0.2-5	42.0	36.0
Fallzahl	4.00	9.00	3.00	2.00

zu Abb. 11: direkte Methode

milliosmol/l	200.0	230.0	260.0	290.
Prozentdiff.	-66.1	-44.2	-23.9	-4.97
Quantil 25	-69.1	-48.0	-28.4	-6.34
Quantil 75	-58.7	-39.3	-21.5	-2.62
Interquantil 50	9.42	8.63	6.93	3.92
Hb	25.1	18.3	12.3	4.50
P-alpha in %	2.6-5	1.7-4	1.0-3	.410
Fallzahl	7.00	7.00	7.00	7.00

zu Abb. 14: Frischblut

mol/l	5.0-4	1.0-3	2.0-3	5.0-3
Prozentdiff.	4.99	.256	-5.39	-9.00
Quantil 25	-.857	.256	-5.39	-13.4
Quantil 75	10.0	.256	-5.39	-4.73
Interquantil 50	10.1	0	0	8.71
t	.900	0	0	2.00
P-alpha in %	53.0	0	0	30.0
Fallzahl	2.00	1.00	1.00	2.00

zu Abb. 14: Überalterte ACD-Konserve

mol/l	5.0-4	5.0-3
Prozentdiff.	21.5	11.7

zu Abb. 15: Frischblut

mol/l	3.0-6	1.0-5	2.5-5	3.0-5	1.0-4	3.0-4
Prozentdiff.	-3.81	1.02	1.98	-5.49	-50.0	-50.0
Quantil 25	-8.79	-2.75	-9.52	-13.7	-50.0	-50.0
Quantil 75	1.17	4.78	13.5	2.70	-49.9	-50.0
Interquantil 50	9.96	7.53	23.0	16.4	.129	0
t	.700	.300	.200	.600	740.	0
P-alpha in %	61.0	81.0	87.0	66.0	8.6-2	0
Fallzahl	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00

zu Abb. 15: Überalterte ACD-Konserve

mol/l	3.0-6	1.0-5	3.0-5	1.0-4
Prozentdiff.	1.45	5.92	12.5	14.7

zu Abb. 16: mit Filter

mol/l	5.0-6	7.0-6	1.0-5	2.0-5	5.0-5	7.0-5	1.0-4
Prozentdiff.	1.58	2.40	3.23	3.76	-14.0	-31.1	-43.5
Quantil 25	1.07	2.17	2.17	1.62	-18.4	-36.7	-45.5
Quantil 75	2.12	2.79	6.11	7.37	-10.3	-28.4	-40.3
Interquantil 50	1.05	.615	3.94	5.75	8.06	8.32	5.18
t	4.10	10.5	2.20	1.00	4.70	10.1	22.7
P-alpha in %	2.60	1.00	12.0	17.0	1.00	.200	2.0-2
Fallzahl	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00

zu Abb. 16: ohne Filter

mol/l	2.0-5	5.0-5	7.0-5	1.0-4
Prozentdiff.	-1.79	-4.45	-6.69	-9.49
Quantil 25	-2.83	-4.83	-7.04	-9.00
Quantil 75	-1.38	-2.62	-2.76	-3.42
Interquantil 50	1.45	2.21	4.28	6.30
t	2.90	4.70	3.70	3.50
P-alpha in %	10.0	4.20	6.60	7.30
Fallzahl	3.00	3.00	3.00	3.00

zu Abb. 17: mit Filter

mol/l	5.0-6	7.0-6	1.0-5	2.0-5	5.0-5	7.0-5	1.0-4
Prozentdiff.	2.08	3.76	4.66	1.33	-7.89	-16.6	-25.5
Quantil 25	1.71	3.55	2.89	.702	-9.83	-18.3	-31.4
Quantil 75	2.45	3.98	6.43	1.88	-5.95	-14.9	-19.5
Interquantil 50	.743	.428	3.54	1.18	3.87	3.35	11.9
t	5.30	16.0	2.50	2.30	3.90	9.50	4.10
P-alpha in %	12.0	3.00	24.0	26.0	16.0	6.70	15.0
Fallzahl	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00

zu Abb. 17: ohne Filter

mol/l	2.0-5	5.0-5	7.0-5	1.0-4
Prozentdiff.	-1.88	-2.99	-4.52	-7.45

zu Abb. 22: mit Filter

% NaCl	.360	.380	.400	.420	.440	.460	.480	.500	.520	.540
% Ery's a.Filt.	14.1	26.5	40.0	51.4	72.0	87.0	78.4	50.9	43.0	17.2
Quantil 25	14.1	26.5	20.7	37.0	64.2	76.7	67.4	47.6	23.7	14.0
Quantil 75	14.1	26.5	49.4	64.9	85.4	88.5	83.8	65.1	62.4	37.3
Interquantil 50	0	0	28.7	27.1	21.2	9.04	16.5	17.5	38.7	22.5
Fallzahl	1.00	1.00	3.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	3.00

% NaCl	.560	.580	.600	.620
% Ery's a.Filt.	22.7	21.7	13.4	10.3
Quantil 25	22.7	21.7	13.4	10.3
Quantil 75	22.7	21.7	13.4	10.3
Interquantil 50	0	0	0	0
Fallzahl	1.00	1.00	1.00	1.00

zu Abb. 22: osmotische Hämolyse

% NaCl	.360	.380	.400	.420	.440	.460	.480	.500	.520	.540
% intrazell.Hb	.998	17.9	45.9	53.1	71.7	88.1	94.2	93.0	91.1	88.0
Quantil 25	.998	17.9	20.1	34.9	60.2	87.3	90.0	88.6	91.1	88.0
Quantil 75	.998	17.9	46.6	63.1	78.9	89.0	95.9	97.5	91.1	88.0
Interquantil 50	0	0	26.6	28.2	18.7	1.70	5.89	8.92	0	0
Fallzahl	1.00	1.00	3.00	4.00	4.00	3.00	3.00	2.00	1.00	1.00

% NaCl	.900
% intrazell.Hb	100.
Quantil 25	100.
Quantil 75	100.
Interquantil 50	0
Fallzahl	1.00

zu Abb. 23

% NaCl	.400	.450	.470	.500	.530	.550	.900
% Ery's a.Filt.	14.0	37.1	35.9	-12.3	6.15	-14.0	.132
Quantil 25	14.0	19.9	35.9	26.6	6.15	-14.1	0
Quantil 75	14.0	43.0	35.9	-7.61	6.15	4.67	.797
Interquantil 50	0	23.1	0	18.9	0	18.2	.797
Fallzahl	1.00	3.00	1.00	3.00	1.00	3.00	3.00

```
++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
+                                                            +
+  FORMATIERTES     $.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,   +
+  LISTEN           stent ab Sprungziel.                     +
+  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe   +
+                   rechtsbuendig, hierbei werden " ;," +
+                   als Trennzeichen in der angegebenen      +
+                   Prioritaet benutzt.                      +
+                                                            +
++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```

```
PROGRAMM   I N P U T                    Ausdruck von 24.11.85
--------   =========                    ---------------------
                                                  Seite  - 1 -


0010 REM ******************** INPUT ***********************
0020 REM                      -----
0030 REM


0040 REM ****  VEREINBARUNGEN  ****
0050 FILES +IMPDAT.+IMPDA1.0
0051 SCRATCH  1
0052 SCRATCH  2
0060 FKEY 01.1E10.1E10.1E10.
0070 FKEY 02.2E10.2E10.2E10:
0080 FKEY 03.3E10.3E10.3E10:
0084 FKEY 04.E-
0085 FKEY 05.E-
0086 FKEY 06.E-
0087 FKEY 07.E-
0088 FKEY 08.E-
0090 DIM A(4,40), A$(4), F(16)
0095 DCL 80 (U0.I0.I00),  32 I00


0100 REM ***
0101 LET I90="   <F1>  <F6>"
0102 LET I00="EINVERSTANDEN?  JA->F1, NEIN->F2"
0103 LET I70="Probe Nr."


0110 REM ***
0111 DISP "F1 <EINGABE>    F2 <KORREKTUR> ";     0115
```

```
PROGRAMM INPUT    24.11.85                    Seite  - 2 -


0112 INPUT I
0113 ON I/1E10 GOTO 120,6000
0114 BEEP
0115 GOTO 111
0120 DISP "DIM.DER VARIABLEN:  (Z.B.001/1)";      0113 0160
0130 RKB I$
0140 IF LEN(I$)<=16 THEN 170
0150 GOSUB 4120
0160 GOTO 120
0170 LET A$(1)=I$      0140


0180 REM ***
0200 DATA % Haemoglobin,% Erys o. Filter,% inaktiv Erys
0210 DATA Ext.Ery-Hb.Hb-Ext.Filter.Ext.Ery-Hb
0300 LET F0=FND(1,3,"Berechnung:",17,50)
0500 LET A$(4)=I$
0510 RESTORE
0520 FOR I=1 TO 3+F0 STEP 1
0530 READ A$(2)
0540 NEXT I
0550 LET A$(3)="Standard"
0555 PRINT
0556 PRINT
0557 PRINT
0560 GOSUB 565
0561 GOTO 600


0565 REM ***  SUB EXT.H2O  ***     0560 0566 04650
0570 LET M0=K0=0
0580 DISP "EXT.H2O GEGEN H2O  OD.F1";     0630
0590 INPUT I
0600 IF I>=1E10 THEN 640
0605 PRINT I,
0610 LET M0=M0+1
0620 LET K0=K0+I
0630 GOTO 580
0640 IF M0=0 THEN 661     0600
0650 LET K0=K0/M0
0660 PRINT
0661 PRINT ,,"MW EXT.H2O (Linearkorrektur) =",K0     0640
0662 DISP I00;     0670
0664 INPUT I
0666 ON I/1E10 GOTO 675.565
0668 BEEP
0670 GOTO 662
0675 RETURN     0666
0680 GOSUB 685     0561
0681 GOTO 715
```

```
PROGRAMM INPUT    24.11.85                    Seite  - 3 -


0685 REM ***  SUB VOLUMENKORREKTUR  ***     0680 0706 04750
0686 DISP "VOL. PROBE.STANDARD  OD. F1";
0690 INPUT I1,I2
0695 LET K=I1/I2
0699 IF K=1 THEN 701
0700 PRINT I1;":";I2
0701 PRINT ,,"Volumenkorrekturfaktor =";K     0699
0702 DISP I00;     0710
0704 INPUT I
0706 ON I/1E10 GOTO 711,685
0708 BEEP
0710 GOTO 702
0711 RETURN     0706


0715 REM ***  STANDARD'S  ***     0681
0720 LET M=0
0730 DISP "STANDARDS: EINZELN=F1, GESAMT=F2";     0770 0852
0740 INPUT F1
0750 LET F1=F1/1E10
0760 ON F1 GOTO 875,775
0765 BEEP
0770 GOTO 730
0775 GOSUB 780     0760
0776 GOTO 875


0780 REM ***  SUB EINGABE STANDARDS (GESAMT)  ***     0775
                                          0852 0860 03050
0781 LET M0=M1=0
0782 PRINT
0790 DISP M0+1;"  STANDARD OD. F1";     0840
0800 INPUT M
0810 IF M>=1E10 THEN 850
0815 PRINT M,
0820 LET M1=M1+M
0830 LET M0=M0+1
0840 GOTO 790
0850 IF M0<>0 THEN 860     0810
0851 BEEP
0852 ON SGN(M)+1 GOTO 730,780
0860 LET M=M1/M0     0850
0864 PRINT
0865 PRINT ,,"MW STANDARD  =",M
0866 DISP I00;     0870
0867 INPUT I
0868 ON I/1E10 GOTO 871,780
0869 BEEP
0870 GOTO 866
0871 FOR I=1 TO N STEP 1     0868
0872 LET A(3,I)=M
0873 NEXT I
```

```
PROGRAMM INPUT    24.11.85                    Seite  - 4 -


0874 RETURN


0875 REM ***  DATENEINGABE  ***     0750 0776 01000
0880 DISP "EINGABE EINZELN=F1, IN SERIE=F2";     0910 0942
0890 INPUT I
0900 ON I/1E10 GOTO 1090.920 ,
0905 BEEP
0910 GOTO 880
0920 DISP A$(1);" VON.BIS.STEP";     0900
0930 INPUT I1,I2,I3
0940 IF I3<>0 THEN 950
0941 BEEP
0942 GOTO 880
0950 FOR I=I1 TO I2 STEP I3     0940
0960 LET M=M+1
0970 LET A(1,M)=I
0972 IF (I>0) AND (I<.01) THEN 975
0973 BUILD I0.I
0974 GOTO 980
0975 BUILD USING 2436.I0.I     0972
0980 DISP I0;A$(1);": ";A$(2);     0974
0990 ON F1 GOTO 1030.1000
1000 INPUT A(2,M)     0990
1010 LET A(3,M)=M
1020 GOTO 1050
1030 DISP ",";A$(3);     0990
1040 INPUT A(2,M),A(3,M)
1050 NEXT I     01020
1060 DISP "EINGABE FERTIG: F1,  WEITER: F2";     01087
                                                 01100
1070 INPUT I
1080 ON I/1E10 GOTO 1210.075
1081 BEEP
1082 GOTO 1060
1090 DISP M+1;": ";A$(1);",";A$(2);     0900 01200
1100 ON F1 GOTO 1110.1120
1110 DISP ",";A$(3);     01100
1120 DISP " >     ","EMDE=F1";   ' 01100
1130 ON F1 GOTO 1140.1150
1140 INPUT A(1,M+1),A(2,M+1),A(3,M+1)     01130
1150 GOTO 1180
1160 INPUT A(1,M+1),A(2,M+1)     01130
1170 LET A(3,M+1)=M
1180 IF A(1,M+1)>=1E10 THEN 1060     01150
1190 LET M=M+1
1200 GOTO 1090
1210 GOSUB 1213     01000 02530
1211 GOTO 2000


1213 REM *** SUB %-RECHNUNG ***     01210 04600 04750 00000
```

```
                                                    0$260 0$270
1220 FOR I=1 TO M STEP 1
1230 LET A(4,I)=K*100+(A(2,I)-K0)/(A(3,I)-K0)
1240 ON F0 GOTO 1260,1260,1250
1250 LET A(4,I)=100-A(4,I)      0$240
1260 NEXT I      0$240 0$240
1270 RETURN


2000 REM *** UEBERSCHRIFT ***      0$211
2010 DISP "KOMMENTAR ZU DIESER KURVE ";
2020 RKB U$
2030 DISP "SAVE DATA IM ";
2031 GOSUB 2090
2032 GOTO 2230


2040 REM *** CONTROL FILENAME ***
2050 GOTO 2090
2060 DISP "INCORRECT FILENAME ";F$;TAB(32);">";      0$150
                                                    0$160 0$210
2070 BEEP
2080 DISP "FILE:          NAME=";      0$031 0$050 0$020
2100 INPUT F$
2110 CONVERT F$ TO F LENGTH L      0$570
2120 LET F=1
2130 IF (F(1)=42) OR (F(1)=43) THEN 2150
2140 LET F=0
2150 IF (L>8) OR (L)6+F) THEN 2060      0$130
2160 IF (F(F+1)<65) OR (F(F+1))90) THEN 2060
2170 FOR I=F+2 TO L STEP 1
2180 LET X=F(I)
2190 IF (X)64) AND (X<91) THEN 2220
2200 IF (X)47) AND (X<58) THEN 2220
2210 GOTO 2060
2220 NEXT I      0$190 0$200
2225 RETURN


2230 REM *** KONTROLLAUSDRUCK ***      0$032 0$205
2240 GOSUB 4000
2250 DISP I$8;      0$281
2260 INPUT I
2270 ON I/1E10 GOTO 2290,2282
2280 BEEP
2281 GOTO 2230
2282 GOSUB 4400      0$270
2283 DISP "KONTROLLAUSDRUCK?  JA>F1,NEIN>F2";      0$287
2284 INPUT I
2285 ON I/1E10 GOTO 2230,2290
2286 BEEP
2287 GOTO 2283
```



```
2290 GOSUB 2300      0$270 0$205
2291 GOTO 2405


2300 REM *** SUB DATEN -> +INPDAT ***      0$290 0$205
2310 WRITE :1,U$,"K0=",K0,"K=",K,"M=",M
2311 LET U=LEN(U$)/4
2312 LET U=INT(U)+SGN(U-INT(U))+1
2313 LET U=U*4+40
2320 FOR I=1 TO 4 STEP 1
2330 WRITE :1,A$(I)
2331 LET U1=LEN(A$(I))/4
2332 LET U1=4*(INT(U1)+SGN(U1-INT(U1))+1)
2333 LET U=U+U1
2340 NEXT I
2350 FOR J=1 TO M STEP 1
2360 FOR I=1 TO 4 STEP 1
2370 WRITE :1,A(I,J)
2371 LET U=U+8
2380 NEXT I
2390 NEXT J
2400 WRITE :1,F$
2401 WRITE :2,F$,U
2402 RETURN


2405 REM *** ABFRAGE NAECHSTE KURVE ***      0$291
2410 DISP A$(1)+".Stand.& Korrekt.pich.:->F1>>>>>>>>>>  od.
                                                  neu ->F2";      0$440
2420 INPUT I
2430 ON I/1E10 GOTO 2450,2540
2435 BEEP
2440 GOTO 2410
2450 FOR I=1 TO M STEP 1      0$430
2451 LET X=A(1,I)
2452 IF (X)0) AND (X<.01) THEN 2455
2453 BUILD I$,X
2454 GOTO 2460
2455 BUILD USING 2456,I$,X      0$452
2456  $$.$$$$$$'
2460 DISP I$,A$(1);": ";A$(2);      0$454
2470 ON F1 GOTO 2500,2480
2480 INPUT A(2,I)      0$470,
2490 GOTO 2520
2500 DISP ";";A$(3);      0$470
2510 INPUT A(2,I),A(3,I)
2520 NEXT I      0$490
2530 GOTO 1210


2540 REM *** ENDE ***      0$430
2550 CHAIN "INPUT1"
```



```
3000 REM *** SUB AUSDRUCK TABELLE   ******      0$070 0$090
3010 PRINT
3020 PRINT
3030 PRINT
3040 PRINT U$
3050 PRINT
3060 PRINT "FILE ";F$
3070 PRINT
3080 PRINT "LINEARKORREKTUR(EXT.M20)
                                        ",K0,"VOLUMENKORREKTUR =";K
3090 LET I$=""
3100 PAD I$,126
3110 PRINT I$
3120 PRINT      0$070 0$090
3270 PRINT
        FN2$(M2-M1,5,"-","","|","----------------|","-----|")
3300 BUILD USING 3310,I$,I$
3310  'LLLLLLLLLLLLLLLL
3320 FOR I=M1 TO M2 STEP 1
3330 BUILD USING 3340,I$,I
3340  $$$$$$
3350 LET I$=I$+I$
3360 NEXT I
3370 PRINT I$
3380 LET
        I$=FN2$(M2-M1+1,5,"-","","|","----------------|","")
3385 PRINT I$
3390 FOR J=1 TO 4 STEP 1
3400 BUILD USING 3410,I$,A$(J)
3420 FOR I=M1 TO M2 STEP 1
3430 LET X=A(J,I)
3440 IF J>1 THEN 3460
3450 IF (X)0) AND (X<.1) THEN 3610
3460 IF X>=1E4 THEN 3610      0$440
3470 IF ABS(X)>=1 THEN 3520
3471 IF X<>0 THEN 3480
3472 LET I$=""      0$
3473 GOTO 3660
3480 BUILD USING 3490,I$,X      0$471
3490  $$.$$$
3500 LET I$=REP$(I$,"0","",1,1)+"|"
3510 GOTO 3660
3520 LET I=5+10*(INT(LGT(ABS(X)))-3)+SGN(X)      0$470
3530 LET I=4-INT(LGT(ABS(X+1)))
3540 IF I<0 THEN 3560
3550 LET I=1
3560 LET I2=I1+4      0$340
3570 LET I2$=EXT$("$$$$$.$$",11,I2)+"|"
3580 BUILD USING I2$,I$,X
3590 GOTO 3660
```



```
3610 BUILD USING 3620,I$,X      0$450 0$460
3620  $$.$$$$
3630 LET I$=REP$(I$," ","",1,1)
3640 LET I$=REP$(I$,"E-0","-",1,1)
3650 LET I$=REP$(I$,"E+0","+",1,1)+"|"
3660 LET I$=I$+I$      0$473 0$510 0$590
3670 NEXT I
3680 PRINT I$
3690 IF J<4 THEN 3710
3700 LET
        I$$=FN2$(M2-M1,5,"-","","|","----------------|",
                                                        "-----|")
3710 PRINT I$$      0$690
3720 NEXT J
3730 RETURN


4000 REM ***  SUBROUTINE FUER   *****      0$240 0$140
4010 REM      AUFRUF DER TABELLEN-SUBROUTINE IN
                                                ZEHNERGRUPPEN
4020 LET Z=0
4030 LET M1=Z*10+1      0$110
4040 LET M2=Z*10+10
4050 IF M2<M THEN 4090
4060 LET M2=M
4070 ON SGN(Z)+1 GOSUB 3000,3120
4080 RETURN
4090 ON SGN(Z)+1 GOSUB 3000,3120      0$030
4100 LET Z=Z+1
4110 GOTO 4030


4120 REM *** SUB STRING > 12 ***      0$30
4130 DISP "EINGABE ZU LANG  (MAX.16)"
4140 FOR I=1 TO 3 STEP 1
4150 BEEP
4160 DELAY 1
4170 NEXT I
4180 DELAY 10
4190 RETURN


4200 REM *** FN2$ ***
4201 DEF FN2$(M,M,I$,I$,I$,I$,I$,I$)I,F$,F$
4202 DCL 80 (FN*6,F$,F$)
4203 LET F$=""
4204 FOR I=1 TO M STEP 1
4205 LET F$=F$+I$
4206 NEXT I
4207 LET F$=I$+F$+I$
4208 LET F$=""
4209 FOR I=1 TO M STEP 1
```

```
4210 LET F1$=F1$+F$
4211 NEXT J
4212 LET FN=8*J1$+F1$+J2$
4213 FNEND


4214 REM ******


4300 REM *** FN DISP ***
4301 DEF FND(S,M,I$,T,Z)I,J,F,I2$
4302 DCL 30 I1$,  4 I2$
4303 BUFFER 032.4
4304 FOR J=1 TO 10 STEP 1     04329 04332
4305 DISP "  Bitte End OF LINE druecken!"
4306 FOR I=1 TO 3 STEP 1
4307 BEEP
4308 DELAY 1
4309 NEXT I
4310 DELAY 10
4311 RESTORE
4312 FOR I=1 TO S-1 STEP 1
4313 READ I$
4314 NEXT I
4315 FOR F=1 TO M STEP 1
4316 READ I$
4317 DISP I$,T+B(T),I$
4318 BEEP
4319 RECEIVE 032.I2$ AND GO
4320 FOR I=1 TO 10*Z-LCT(J) STEP 1
4321 TEST 032
4322 ON LOC(0)+1 GOTO 4330.4323
4323 NEXT I     04322
4324 CMD 032.16
4325 NEXT F
4326 NEXT J
4327 DISP "Bitte 'END OF LINE' druecken und Frage nach
                                        ";I1$;" beantworten!"
4328 RECEIVE 032.I2$
4329 GOTO 4304
4330 DISP I$;"   richtig->F1, falsch->F2";     04322 04334
4331 INPUT I
4332 ON I/1E10 GOTO 4335.4304
4333 BEEP
4334 GOTO 4330
4335 LET FN=F      04332
4336 FNEND


4337 REM *** ***
```



```
4400 REM *** SUB KORREKTUR *** ***      02202 06130
4401 PRINT
4402 PRINT
4403 PRINT
4405 BUFFER 032.80
4420 DISP "UEBERSCHRIFT"+I9$,     04460 04500
4430 INPUT I
4440 ON I/1E10 GOTO 4510.4470
4450 BEEP
4460 GOTO 4420
4470 SEND 040.U$     04440
4475 CMD 040.1
4480 RECEIVE 032.U$
4490 PRINT U$
4500 GOTO 4420
4510 DISP "FILE "+F$+I9$;     04440 04550 04590
4520 INPUT I
4530 ON I/1E10 GOTO 4600.4560
4540 BEEP
4550 GOTO 4510
4560 SEND 040.F$     04530
4565 CMD 040.1
4566 RECEIVE 032.F$
4570 GOSUB 2110
4580 PRINT F$
4590 GOTO 4510
4600 DISP "EXT.H20"+I9$;     04530 04640
4610 INPUT I
4620 ON I/1E10 GOTO 4700.4630
4630 BEEP
4640 GOTO 4600
4650 GOSUB 565     04620
4660 GOSUB 1215
4700 DISP "VOLUMENKORREKTUR"+I9$;     04620 04740
4710 INPUT I
4720 ON I/1E10 GOTO 4800.4730
4730 BEEP
4740 GOTO 4700
4750 GOSUB 685     04720
4760 GOSUB 1215
4800 DISP "DIMENSIONEN"+I9$;     04720 04840 04900
4810 INPUT I
4820 ON I/1E10 GOTO 4990.4830
4830 BEEP
4840 GOTO 4800
4850 LET I$=""     04820
4860 FOR I=1 TO 4 STEP 1
4870 LET I$=I$+A$(I)+CHR$(0)
4880 NEXT I
4890 SEND 040.I$
4900 CMD 032.1
4910 RECEIVE 032.I$
```



```
4920 FOR I=1 TO 4 STEP 1
4930 ASSIGN I$.A$(I).0
4940 LET I$=REP$(I$.A$(I)+CHR$(0),"",1,1)
4950 PRINT A$(I).
4960 NEXT I
4970 PRINT
4980 GOTO 4800
4990 ON F1 GOTO 5060.5000     04820
5000 DISP "STANDARD"+I9$;     04990 05040
5010 INPUT I
5020 ON I/1E10 GOTO 5060.5030
5030 BEEP
5040 GOTO 5000
5050 GOSUB 700     05020
5051 GOSUB 1215
5060 DISP "WERTE"+I9$;     04990 05020 05100 05125 05290
5070 INPUT I
5080 ON I/1E10 GOTO 5300.5110
5090 BEEP
5100 GOTO 5060
5110 DISP I7$.     05000 05160
5120 INPUT M7
5125 IF (M7<1) OR (M7>=1E10) THEN 5060
5130 IF (M7>0) AND (M7<=M) THEN 5170
5140 BEEP
5150 DISP "M =";M."!!!".
5160 GOTO 5110
5170 LET I$=""     05130
5180 FOR J=1 TO 3 STEP 1
5190 BUILD I$.A(J.M7)
5200 LET I$=I$+CHR$(0)
5210 NEXT J
5220 SEND 040.I$
5230 CMD 040.1
5240 RECEIVE 032.I$
5250 ASSIGN I$.A(1.M7).A(2.M7).A(3.M7);0
5260 GOSUB 1215
5270 PRINT I7$.A$(1).A$(2).A$(3).A$(4)
5280 PRINT M7.A(1.M7).A(2.M7).A(3.M7).A(4.M7)
5290 GOTO 5060
5300 DISP "LOESCHEN?     JA->F1,  NEIN->F2";     05080
                                                 05340
5310 INPUT I
5320 ON I/1E10 GOTO 5350.5600
5330 BEEP     05300
5340 GOTO 5300
5350 DISP I7$."   od.[F1]  ";     05320 05430 05520
5360 INPUT M7
5370 IF (M7<1) OR (M7=1E10) THEN 5600
5380 IF M7>M THEN 5330
5390 PRINT "geloesche wird "+I7$;M7
5400 PRINT .A(1.M7).A(2.M7).A(3.M7).A(4.M7)
```



```
5410 DISP I8$;     05450
5420 INPUT I
5430 ON I/1E10 GOTO 5460.5350
5440 BEEP
5450 GOTO 5410
5460 FOR I=M7 TO M-1 STEP 1     05430
5470 FOR J=1 TO 4 STEP 1
5480 LET A(J.I)=A(J.I+1)
5490 NEXT J
5500 NEXT I
5510 LET M=M-1
5520 GOTO 5350
5600 IF M=40 THEN 5850     05320 05370
5605 DISP "EINFUEGEN?     JA->F1,  NEIN->F2";     05610
5610 INPUT I
5620 ON I/1E10 GOTO 5630.5850
5630 BEEP
5640 GOTO 5605
5645 BEEP     05620
5650 DISP "Zusatz auf Platz Nr.="?  od.[F1]";     05530
                                                 05020
5660 INPUT M7
5665 IF M7=1E10 THEN 5850
5670 IF (M7<1) OR (M7>M+1) THEN 5645
5690 FOR I=M TO M7 STEP -1
5700 FOR J=1 TO 4 STEP 1
5710 LET A(J.I+1)=A(J.I)
5720 NEXT J
5730 NEXT I
5740 LET M=M+1
5750 DISP A$(1)+"="?  "+A$(2)+"="?  "+A$(3)+"=";     05020
5760 INPUT A(1.M7).A(2.M7).A(3.M7)
5770 GOSUB 1215
5780 PRINT I7$.A$(1).A$(2).A$(3).A$(4)
5790 PRINT M7.A(1.M7).A(2.M7).A(3.M7).A(4.M7)
5800 DISP I8$;
5810 INPUT I     05040
5820 ON I/1E10 GOTO 5630.5750
5830 BEEP
5840 GOTO 5810
5850 RETURN     05600 05620 05665


6000 REM *** FILE-KORREKTUR ***     0113
6001 DISP "STANDARDS: EINZELN=F1. GESAMT=F2";     06006
6002 INPUT F1
6003 LET F1=F1/1E10
6004 ON F1 GOTO 6007.6009
6005 BEEP
6006 GOTO 6001
6007 PRINT "STANDARDS: EINZELN".     06004
6008 GOTO 6010
```

```
6009 PRINT "STANDARDS: GESAMT",      06004
6010 DISP "BERECHNUNG  F1:(%)  F2:(100-%) ";      06000
                                                  06013
6011 INPUT F0
6012 LET F0=F0/1E10+1
6013 ON F0 GOTO 6016,6016,6018
6014 BEEP
6015 GOTO 6010
6016 PRINT "BERECHNUNG  IN %"      06013 06013
6017 GOTO 6020
6018 PRINT "BERECHNUNG IN 100-%"      06013
6020 GOSUB 2090      06017
6025 DISP "READING FILE ";F$
6030 FILE  3,F$
6040 READ :3,U$,I$,K0,I0,K,I0,M
6050 FOR I=1 TO 4 STEP 1
6060 READ :3,A$(I)
6070 NEXT I
6080 FOR J=1 TO M STEP 1
6090 FOR I=1 TO 4 STEP 1
6100 READ  3,A(I,J)
6110 NEXT I
6120 NEXT J
6130 GOSUB 4400      06170
6140 GOSUB 4000
6150 DISP 100;      06190
6160 INPUT I
6170 ON I/1E10 GOTO 6200,6130
6180 BEEP
6190 GOTO 6130
6200 DISP "FILE ";F$;" wird ueberschrieben"      06170
6205 GOSUB 2300
6210 CHAIN "INPUT2"
6220 END
```

***** ENDE PROGRAMM INPUT ******

```
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
+
+  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,
+  LISTEN:          steht am Sprungziel.
+  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe
+                   rechtsbuendig; hierbei werden " ;)," 
+                   als Trennzeichen in der angegebenen
+                   Prioritaet benutzt.
+
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```

```
PROGRAMM  I N P U T 1                    Ausdruck vom 24.11.
--------  ===========                    -------------------
                                                   Seite - 1
```

```
0010 REM **** INPUT1 *****
0020 REM
0030 REM  CHAIN VON INPUT
0040 REM

0050 REM ****  VEREINBARUNGEN  ****
0060 BUFFER 032.00
0070 DIM F0(100), U(100)
0080 FILES +INPDA1
0090 REM

0100 REM ***
0110 LET F=0
0120 READ :1,F0(F+1),U(F+1) EOF 150      0140
0130 LET F=F+1
0140 GOTO 120
0150 SCRATCH :1      0120
0160 FOR I=2 TO F STEP 1
0170 WRITE :1,F0(I),U(I)
0180 NEXT I
0190 BUILD U$,U(1)
0200 SEND 040,"CREATE U,"+F0(1)+",S,"+U$
0210 DISP "          END OF LINE & F1"
0220 FKEY 01,RUN INPUT2:
0230 ON F GOTO 250
0240 FKEY 01,RUN INPUT1:
0250 BEEP      0230
```



```
0251 END
```

***** ENDE PROGRAMM INPUT1 ******

```
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
+
+  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,
+  LISTEN:          steht am Sprungziel.
+  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe
+                   rechtsbuendig; hierbei werden " ;)," 
+                   als Trennzeichen in der angegebenen
+                   Prioritaet benutzt.
+
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```

```
PROGRAMM  I N P U T 2                    Ausdruck vom 24.11
--------  ===========                    -------------------
                                                   Seite -
```

```
0010 REM **** CHAIN VON INPUT1 ****
0020 REM
0030 REM DATENUEBERTRAGUNG AUF GEWUENSCHTES FILE

0040 REM ****  VEREINBARUNGEN  ****
0050 DIM A(4,100), A$(4)
0060 DCL 00 K0
0070 FILES +INPDAT:0

0080 REM ***      0321
0090 DISP "DATENUEBERTR. AUF FILE: "
0100 READ :1,K0,I0,K0,I0,K,I0,M EOF 330
0110 FOR I=1 TO 4 STEP 1
0120 READ :1,A$(I)
0130 NEXT I
0140 FOR J=1 TO M STEP 1
0150 FOR I=1 TO 4 STEP 1
0160 READ :1,A(I,J)
0170 NEXT I
0180 NEXT J
0190 READ :1,I0

0200 REM *** DATENUEBERTR. AUF FILE: I0 ***
0210 DISP "DATENUEBERTR. AUF FILE: "+I0
0220 FILE : 2,I0
0230 SCRATCH :2
```

```
0240 WRITE  2,K$,"K0=",K0,"K=",K,"M=",M
0250 FOR I=1 TO 4 STEP 1
0260 WRITE  2,A0(I)
0270 NEXT I
0280 FOR J=1 TO M STEP 1
0290 FOR I=1 TO 4 STEP 1
0300 WRITE  2,A(I,J)
0310 NEXT I
0320 NEXT J
0321 GOTO 80


0330 REM *** CHAIN INPUT ***      0100
0335 DISP "RETURN TO INPUT"
0340 CHAIN "INPUT"
0350 END


ENDE PROGRAMM INPUT2   ******
```

```
+*************************************************************
+                                                           +
+  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,  +
+  LISTEN:          steht am Sprungziel.                    +
+  -------------    Bei "LINE OVERFLOW" Rasterschemausgabe  +
+                   rechtsbuendig; hierbei werden " ;," ,   +
+                   als Trennzeichen in der angegebenen     +
+                   Prioritaet benutzt.                     +
+                                                           +
+*************************************************************
```

```
PROGRAMM  C M D                          Ausdruck vom 24.11.85
--------  =====                          ---------------------
                                                  Seite  - 1 -


0010 REM ***************** COMMAND *********************
                                  -------
0020 REM
0030 REM
0040 REM STEUERT AUSWERTUNGSPROGRAMME FILTERVERSUCHE,
0041 REM                        DESORPTION & ULTRASCHALL


0050 REM ****  VEREINBARUNGEN  ****
0060 FILES *,+PLDATA
0070 DIM A(2,150), F$(40), Z$(40), F(40)
0080 DCL 8808, 7F$(), 1Z$(), 32(18,118,128,K$,Y$)
0090 FKEY 01,1,1:
0100 FKEY 02,2,2:
0110 FKEY 03,3,3:
0120 FKEY 04,4,4:
0130 FKEY 05,5,5:
0140 FKEY 06,6,6:
0150 FKEY 07,7,7:
0160 FKEY 08,WIE TAB,1:
0170 LET B0=0
0180 LET F1=F2=F3=F4=2


0200 REM *** ABFRAGE UEBERSCHRIFT ***     0930
0210 DISP "BILDUEBERSCHRIFT",     0260
0220 RKB U$
0230 PRINT U$
0240 DISP "EINVERSTANDEN:  (JA)  (NEIN) ";     0270
0250 INPUT I
```



```
0260 ON I GOTO 300,210
0270 GOTO 240


0300 REM *** ABFRAGE D. OPTIONS F. KOORD.-KREUZ & LEGENDE
                                          ***     0260 0970
0310 DISP "X-AXIS: (LIN) (LOG) (LOG+CONTR)";     0320
0320 INPUT L0
0330 IF (L0<1) OR (L0>3) THEN 310
0340 DISP "LEGENDE: (TAB=J) (TAB=M) (MIX)";     0370
0350 INPUT T
0360 ON T GOTO 380,380,390
0370 GOTO 340
0380 LET F1=1     0360 0360
0390 DISP "DIMENS.X-ACHSE? // WIE TAB.1=F8";     0380
0400 RKB X$
0410 DISP "DIMENS.Y-ACHSE? // WIE TAB.1=F8";
0420 RKB Y$
0430 GOTO 450
0440 BEEP     0510 0530
0450 DISP "YAXIS: BEREICH VON,BIS";     0430
0460 ON L0 GOTO 470,500,500
0470 DISP ",MARKIERG.";     0460
0480 INPUT X1,X2,T1
0490 GOTO 530
0500 INPUT X1,X2     0460 0460
0510 IF (X1=0) OR (X2=0) THEN 440
0520 LET T1=1
0530 IF (X1=X2) OR (T1=0) THEN 440     0490
0540 IF X1<X2 THEN 600
0550 LET I=X1
0560 LET X1=X2
0570 LET X2=I
0580 GOTO 600
0590 BEEP     0620
0600 DISP "YAXIS: BEREICH VON,BIS,MARKIERG.";     0540 0580
0610 INPUT Y1,Y2,T2
0620 IF (Y1=Y2) OR (T2=0) THEN 590
0630 IF Y1<Y2 THEN 670
0640 LET I=Y1
0650 LET Y1=Y2
0660 LET Y2=I
0670 DISP "BILDBREITE, -HOEHE  (IN ZOLL!)";     0630 0710
0680 INPUT B,H
0690 IF (B<=0) AND (H<20) THEN 720
0700 BEEP
0710 GOTO 670
0720 PRINT "YAXIS: ";X$;     0690
0730 ON L0 GOTO 740,760,760
0740 PRINT " (LINEAR)";     0730
0750 GOTO 800
0760 PRINT " (LOGAR.";     0730 0730
```



```
0770 IF L0<3 THEN 790
0780 PRINT " mit KONTR.=0";
0790 PRINT ")";     0770
0800 PRINT TAB(41);"YAXIS: ";Y$     0750
0810 PRINT "VON";X1;"BIS";X2;
0820 ON L0 GOTO 830,840,840
0830 PRINT "STEP";T1;     0820
0840 PRINT TAB(41);     0820 0820
0850 PRINT "VON";Y1,"BIS";Y2;"STEP";T2
0860 PRINT "BREITE =";B;TAB(21);"HOEHE =";H;TAB(41);
0870 ON T GOSUB 890,910,930
0880 GOTO 950
0890 PRINT "LEGENDE MIT VERTETABELLE"     0870
0900 RETURN
0910 PRINT "LEGENDE OHNE VERTETABELLE"     0870
0920 RETURN
0930 PRINT "KEINE LEGENDE"     0870
0940 RETURN
0950 DISP "EINVERSTANDEN?  ja->F1, nein->F2";     0880 0990
0960 INPUT I
0970 ON I GOTO 2000,300
0980 BEEP
0990 GOTO 950


2000 REM *** ABFRAGE D. FILES & D. OPTIONS F.D. EINZELNEN
                                          KURVEN ***     0970
2010 GOSUB 4500
2020 LET N=1     0240
2030 LET N0=0
2040 DISP N;")   FILE = ?     ENDE->F4",     02000 02200
                                                     02420
2050 RKB I$
2060 IF I$="1,1" THEN 2290
2070 GOSUB 6000
2080 IF I$="" THEN 2040
2090 LET F$(N)=I$
2100 DISP "ZEICHEN=?   FUER SAEULE:ZEICHEN='DEL'-TASTE";
2110 INPUT Z$(N)
2120 LET I=0
2130 IF Z$(N)="B" THEN 2240
2140 DISP "KURVE:(GER)(EFUN)(POLY)(Z=EFUN)-","ODER(B)";
                                                     02170
2150 INPUT I
2160 ON I+1 GOTO 2240,2240,2240,2180,2240
2170 GOTO 2140
2180 DISP "GRAD DES POLYNOMS ?    ->(MAX.9)";     02160
                                                     02220
2190 INPUT I1
2200 IF I1<10 THEN 2230
2210 BEEP
2220 GOTO 2180
```

```
2230 LET I=I+INT(I/10)      02200
2240 LET F(M)=I      02130 02160 02160 02160 02160
2250 LET I=M
2260 GOSUB 4200
2270 LET M=M+1
2280 GOTO 2040
2290 LET M=M-1      02060
2300 IF M>N0 THEN 2350
2310 LET N=N0
2320 ON SGN(M) GOTO 2350
2330 BEEP
2340 GOTO 2020
2350 DISP "EINVERSTANDEN (JA)<NEIN)<PRINT)";      02300
                                                  02320 02300 02440 02500
2360 INPUT I
2370 ON I GOTO 2510,2390,2450
2380 GOTO 2350
2390 LET N0=M      02370
2400 DISP "NR. DER FALSCHEN ZEILE ";
2410 INPUT M
2420 IF (M>=1) AND (M<=N0+1) THEN 2040
2430 LET M=N0
2440 GOTO 2250
2450 GOSUB 4300      02370
2460 FOR I=1 TO M STEP 1
2470 GOSUB 4200
2480 NEXT I
2490 ON SGN(M-3) GOSUB 4000
2500 GOTO 2350
2510 ON SGN(B0) GOTO 2540      02370
2520 SCRATCH  2
2530 LET U0=0
2540 LET B0=B0+1      02510

3000 REM *** Berechnung der SCALE-Parameter ***
3005 RESTORE
3010 DATA .9,.7,.5,.2,.3,.1,.1,.15,.15
3020 READ A1,A2,A3,B2,H2,B3,H3
3030 LET I=(B+H)/8
3040 IF I<1 THEN 3120
3050 LET B2=B2+1
3060 LET H2=H2+1
3070 LET B3=B3+1
3080 LET H3=H3+1
3090 LET A2=A2+1
3100 LET A1=A1*SQR(I)
3110 LET A3=A3+1
3120 ON L0 GOTO 3160,3130      03040
3130 LET A1=A1+A3      03120
3140 LET X1=LGT(X1)      03120
3150 LET X2=LGT(X2)
```



```
3160 LET X0=(A1*X2+X1*(A2-B))/(A1+A2-B)      03120
3170 LET X9=(B*X2-A2*X0)/(B-A2)
3180 LET M1=(X9-X0)/8
3190 LET Y0=(O1*Y2+Y1*(O2-H))/(O1+O2-H)
3200 LET Y9=(H*Y2-O2*Y0)/(H-O2)
3210 LET M2=(Y9-Y0)/H
3220 LET X5=X0+.6*M1
3230 LET X6=(X5+X1)/2

3500 REM *** Parameter zwar ein Bild nach +PLOATA ***
3510 DEF FNL(I$)=4+INT(LEN(I$)/4+.9)*4
3520 WRITE :2,L0*T/10,U0,X0,Y0,X1,X2,T1,Y1,Y2,T2
3530 WRITE
     2,B,H,A1,A2,O1,O2,A3,B2,H2,B3,H3,X0,X9,M1,Y0,Y9,M2,X5
3540 LET U0=U0+26*8+FNL(U$)+FNL(X$)+FNL(Y$)
3550 FOR I=1 TO M STEP 1
3560 DISP I,F$(I);">";Z$(I);F(I)
3570 FILE : 1,F$(I)
3580 READ :1,U0,I$,X,I$,X,I$,M1,I1$,I$,I$,I2$
3590 FOR J=1 TO M1 STEP 1
3600 READ :1,A(1,J),X,X,A(2,J)
3610 NEXT J
3620 LET T0=2
3630 READ :1,I$ EOF 3650
3640 LET T0=1
3650 WRITE :2,U0,M1,I1$,I2$,T0      03630
3660 LET U0=U0+FNL(U$)+8+FNL(I1$)+FNL(I2$)+8
3670 FOR J=1 TO M1 STEP 1
3680 WRITE :2,A(1,J),A(2,J)
3690 LET U0=U0+2*8
3700 NEXT J
3710 ON T0 GOTO 3720,3770
3720 FOR J=1 TO 26 STEP 1      03710
3730 READ :1,X
3740 WRITE :2,X
3750 LET U0=U0+8
3760 NEXT J
3770 IF Z$(I)<>"B" THEN 3790      03710
3780 GOSUB 4370
3790 WRITE :2,Z$(I),F(I),SGN(M-1)+1      03770
3800 LET U0=U0+FNL(Z$(I))*2+8
3810 ON INT(F(I))-1 GOTO 3830,3850,3870
3820 GOTO 3880
3830 LET F2=1      03810
3840 GOTO 3880
3850 LET F3=1      03810
3860 GOTO 3880
3870 LET F4=1      03810
3880 NEXT I      03820 03840 03860
3890 PRINT      03950
```



```
3900 PRINT ,"FILE '+PLOATA' enthaelt
                        jetzt",U0;"Bytes!",TAB(1);" ";TAB(1)
3910 DISP "NOCH'M BILD'  ja->F1, nein->F2 ";
3920 INPUT I
3930 ON I GOTO 200,9000
3940 BEEP
3950 GOTO 3890

4000 REM *** SUB 10 LEEHZ ***      02490
4010 FOR I=1 TO 10 STEP 1
4020 PRINT
4030 NEXT I
4040 RETURN

4200 REM *** SUB ZEILENAUSDRUCK FILE 4 OPTION ***      02260
                                                       02470
4210 LET I$=Z$(I)
4220 IF I$<>"B" THEN 4240
4230 LET I$="SAEULE"
4240 PRINT I;TAB(7),F$(I),I$,      04220
4250 ON INT(F(I))+1 GOTO 4260,4280,4300,4320,4340
4260 PRINT "KEINE VERBINDUNG",      04250
4270 GOTO 4350
4280 PRINT "GERADEN",      04250
4290 GOTO 4350
4300 PRINT "E-FUNKTION",      04250
4310 GOTO 4350
4320 PRINT "POLYNOM",      04250
4330 GOTO 4350
4340 PRINT "2 E-FUNKTIONEN",      04250
4350 PRINT TAB(70);F(I)      04270 04290 04310 04330
4360 RETURN

4500 REM *** SUB UEBERSCHRIFT      02810 02430
4510 PRINT
4520 PRINT
4530 PRINT "NR.
     FILE","VERTMARKIERUNG",
                        "PUNKTVERBINDUNG-KURVENANPASSUNG";
4540 PRINT TAB(70);"CODE"
4550 PRINT
4560 RETURN

4570 REM *** SUB SAEULENBREITE ***      02700
4580 REM S = Saeulenbreite in Zoll, hoechst,
4590 LET S=(B-A1-A2)/10
4600 FOR J=2 TO M1 STEP 1
4610 LET J1=A(1,J)
```



```
4620 LET J2=A(1,J-1)
4630 ON L0 GOTO 4660,4640,4640
4640 LET J1=LGT(J1)      04630 04630
4650 LET J2=LGT(J2)
4660 LET J0=ABS(J1-J2)/M1      04630
4670 IF J0>=S THEN 4690
4680 LET S=J0
4690 NEXT J      04670
4700 LET F(I)=S/20
4710 RETURN

6000 REM *** SUB FILENAME ***      02070
6010 LET I(1)=0
6020 GOTO 6110
6030 DISP "INCORRECT FILENAME "+I$      06130 06160 06170
                                                      0622
6040 BEEP
6050 DELAY 10
6060 BEEP
6070 DELAY 10
6080 BEEP
6090 LET I$=""
6100 RETURN
6110 CONVERT I$ TO I LENGTH L      06020
6120 LET F=1
6130 IF (I(1)=42) OR (I(1)=43) THEN 6150
6140 LET F=0
6150 IF L>6+F THEN 6030      06130
6160 IF L=F THEN 6030
6170 IF (I(F+1)<65) OR (I(F+1)>90) THEN 6030
6180 FOR I=F+2 TO L STEP 1
6190 LET X=I(I)
6200 IF (X>64) AND (X<91) THEN 6230
6210 IF (X>47) AND (X<58) THEN 6230
6220 GOTO 6030
6230 NEXT I      06200 06210
6240 RETURN

9000 REM *** STEUERUNG ***      03930
9010 FILE : 1,"+FLKHF"
9020 SCRATCH :1
9030 WRITE :1,F1,F2,F3,F4
9040 DISP "      BITTE ETWAS GEDULD"
9050 CHAIN "CMD1"
9060 END

ENDE PROGRAMM CMD ******
```

```
*****************************************************
*                                                   *
*  FORMATIERTES     @.... = Zeilennr. mit Sprungannweisung,  *
*  LISTEN:          steht an Sprungziel.             *
*  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe   *
*                   rechtsbuendig, hierbei werden " ;)," *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen      *
*                   Prioritaet benutzt.              *
*                                                   *
*****************************************************
```

```
PROGRAMM  C M D 1                          Ausdruck von 24.11.85
--------  ======                           ---------------------
                                                   Seite  - 1 -

0010 REM CHAIN VON CMD
0020 REM
                  ---

5000 REM *** STEUERUNG ***      05390
5010 DCL B0 (I8,J8)
5020 FILES +FLKMF,+INPDAT,+RETURN
5030 READ :1,F1,F2,F3,F4
5040 FKEY 01,1,1:
5050 FKEY 02,2,2:
5060 RESTORE
5070 RESTORE :1
5080 SCRATCH :2
5090 DATA FITEFN,FITPOL,PEEL2,PLOT0,KNARK,XYPLOT,PLTR0
5100 LET F(1)=F2
5110 LET F(2)=F3
5120 LET F(3)=F4
5130 LET F(4)=1
5140 LET F(5)=INT((F2+F3+F4)/3)
5150 LET F(6)=1
5160 LET F(7)=F1
5170 LET F=1
5180 FOR I=1 TO 7 STEP 1
5190 READ I0
5200 ON F(I) GOTO 5210,5260
5210 ON F GOTO 5220,5230      05200
5220 LET I18=I0      05210
5230 LET F=2
5240 GOTO 5260
5250 WRITE :3,I0     05210
5260 NEXT I      05200 05240
```

```
PROGRAMM CMD1    24.11.85                          Seite  - 2 -

5270 DISP "CHAIN oder ()=F1; PRI/DIS=F2";
5280 INPUT I2$
5290 IF I2$<>"2" THEN 5800
5300 WRITE :3,"PRIDIS"
5310 DISP "ENDE --> END OF LINE ";      05350
5320 RKB I$
5330 IF I$="" THEN 5360
5340 WRITE :3,I$
5350 GOTO 5310
5360 LET L=P=M=P0=M0=0      05330
5370 DISP "BEEP: Dauer in 1/10 sec, oder 0";
5380 INPUT L
5390 IF L=0 THEN 5440
5400 DISP "Wi.Pause, Wiederholungen ";
5410 INPUT P,M
5420 DISP "Gr.Pause, Wiederholg. insgesamt";
5430 INPUT P0,M0
5440 WRITE :3,"@",L,P,M,P0,M0      05390
5450 DISP " (EDIT) (CONTINUE) ";      05400 05870
5460 INPUT I
5470 ON I GOTO 5490,5900
5480 GOTO 5450
5490 BUFFER B32,80      05470
5500 RESTORE :3
5510 SCRATCH :2
5520 READ :3,I0      05500 05710
5530 SEND B40,I0      05560 05570 05660 05690 05720
5540 CMD B40,1
5550 RECEIVE B32,J0
5560 IF (J0="0") AND (I0<>"0") THEN 5520
5570 IF (J0="") AND (I0="0") THEN 5530
5580 IF J0="" THEN 5520
5590 IF J0="0" THEN 5800
5600 IF J0<>"2" THEN 5700
5610 LET I=LEN(I0)
5620 IF I<66 THEN 5640
5630 LET I=63
5640 DISP "EINFUEGEN VOR";EXT$(I0,1,I);      05620 05670
5650 RKB J0
5660 IF J0="" THEN 5530
5670 IF J0="0" THEN 5640
5680 WRITE :2,J0
5690 GOTO 5530
5700 WRITE :2,J0      05600
5710 IF (J0<>"0") AND (I0<>"0") THEN 5520
5720 IF (J0<>"0") AND (I0="0") THEN 5530
5730 READ :3,L,P,M,P0,M0
5740 BUILD I0,L,P,M,P0,M0
5750 SEND B40,REP$(I0," ",",",-1,1)
5760 CMD B40,1
5770 RECEIVE B32,I0
5780 ASSIGN I0,L,P,M,P0,M0;44
```

```
PROGRAMM CMD1    24.11.85                          Seite  - 3 -

5790 DISP "+RETURN WIRD UEBERSCHRIEBEN"
5800 RESTORE :2
5810 SCRATCH :3
5820 READ :2,I0      05850
5830 DISP I0
5840 WRITE :3,I0
5850 IF I0<>"@" THEN 5820
5860 WRITE :3,L,P,M,P0,M0
5870 GOTO 5450
5880 IF I2$="1" THEN 5900      05290
5890 WRITE :3,I20
5900 DISP I18      05470 05830
5910 CHAIN I18
5920 PRINT
5930 PRINT
5940 END

**  ENDE PROGRAMM CMD1   ******
```

```
*****************************************************
*                                                   *
*  FORMATIERTES     @.... = Zeilennr. mit Sprungannweisung,  *
*  LISTEN:          steht an Sprungziel.             *
*  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe   *
*                   rechtsbuendig, hierbei werden " ;)," *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen      *
*                   Prioritaet benutzt.              *
*                                                   *
*****************************************************
```

```
PROGRAMM  F I T E F N                      Ausdruck von 24.11.85
--------  ===========                      ---------------------
                                                   Seite  - 1 -

0010 REM ***************** FITEFN ***********************
0020 REM
0030 REM


0040 REM ANPASSUNG AN E-FUNKTION: Y=A*EXP(K*X)
0050 REM
0060 REM A(,),C(,)=KOEFFIZIENTENMATRIZEN
0061 REM              DER NORMALGLEICHUNGEN
0070 REM E(,)=VEKTOR DER VERBESSERUNGEN
0071REM


0080 REM ***************************************************

0090 FILES +PLDATA:+PLDAT2:+RETURN:+FLKMF
0100 DIM A(2,2), T(2,2), E(2,1), C(2,1), X(350), Y(350)
0110 DCL B0(I8,U8)
0120 LET M0=0


0200 REM-***      0630
0220 READ :1,L0,I0,I8,I8 EOF 5000
0230 FOR I=1 TO 25 STEP 1
0240 READ :1,X
0250 NEXT I
0255 LET L0=INT(L0)
```

```
0260 REM *** FN READ WERTEPAARE ***
0270 DEF FNR I,J
0280 READ  1.U$,M,I$,I0,T0
0290 FOR I=1 TO M STEP 1
0300 READ :1,X(I),Y(I)
0310 NEXT I
0311 ON T0 GOTO 313,320
0313 FOR I=1 TO 26 STEP 1      0311
0314 READ  1.J
0315 NEXT I
0320 READ  1.I$.F      0311
0330 LET FN=F
0340 FNEND


0350 REM *** FNEND ***
          ;

0500 REM *** GOSUB 2000 & WRITE → PLOAT2 *****      0630
0520 IF FNR(>2 THEN 610
0530 GOSUB 2000
0540 LET N0=N0+1
0550 IF N0>1 THEN 570
0560 SCRATCH  2
0570 WRITE  2,A,K,S0,S1,S2,M      0530


0610 REM *** FORTSETZUNG ***      0520
0620 READ :1,F
0630 ON F GOTO 200,300


2000 REM *** SUB ANPASSUNG FUER EINE GRUPPE *****      0530


2010 REM *** NAEHERUNGEN FUER 'A' UND 'K'
2015 LET M=0
2020 REM GOSUB Erste Naeherung
2030 GOSUB 3000
2040 MAT A=ZER      0210
2050 MAT C=ZER
2060 LET A0=0


2070 REM ***
2080 REM BILDUNG DER DIFFERENZ Ygemessen -Yberechnet F0
2090 REM BILDUNG DER PARTIELLEN ABLEITUNGEN F(1) UND F(2)
2100 REM AUFSTELLUNG DER NORMALGLEICHUNGEN
2110 REM
2120 FOR G=1 TO M STEP 1
2125 IF ABS(X(G)*K)>227 THEN 2500
2130 LET X=X(G)
```



```
2140 LET Y=Y(G)
2150 LET F0=Y-A*EXP(K*X)
2160 LET F(1)=EXP(K*X)
2170 LET F(2)=A*X*EXP(K*X)
2180 FOR I=1 TO 2 STEP 1
2190 FOR J=1 TO 2 STEP 1
2200 LET A(I,J)=A(I,J)+F(I)*F(J)
2210 NEXT J
2220 NEXT I
2230 FOR L=1 TO 2 STEP 1
2240 LET C(L,1)=C(L,1)+F0*F(L)
2250 NEXT L
2260 LET A0=A0+F0↑2
2270 NEXT G


2280 REM ***
2290 REM BERECHNUNG DES VEKTORS E(,) DER VERBESSERUNGEN
                                        FUER        'A' UND 'K'
2300 REM
2310 MAT T=INV(A)
2320 MAT E=T*C
2330 LET D=ABS(E(1,1)/A)+ABS(E(2,1)/K)
2340 LET M=M+1
2350 LET A=A+E(1,1)
2360 LET K=K+E(2,1)
2365 DISP I0;M,A,K


2370 REM ***
2380 REM FALLS VERBESSERUNG KLEIN GENUG ENDE DER ITERATION
2390 REM
2400 IF D<=1E-4 THEN 2450
2410 IF M<1E3 THEN 2040
2420 REM
2430 REM BERECHNUNG DER STANDARDABWEICHUNGEN
2440 REM
2450 LET S0=SQR((A0-C(1,1)*E(1,1)-C(2,1)*E(2,1))/4)
                                                      0200
2460 LET S1=S0*SQR(A(2,2)/DET)
2470 LET S2=S0*SQR(A(1,1)/DET)
2480 RETURN


2500 REM *** ANPASSUNG NICHT MOEGLICH:      0125
2510 LET A=S0=S1=S2=9E90
2520 LET K=0
2530 RETURN


3000 REM *** Erste Naeherung ***      0030
3005 LET I=LEN(U$)
```



```
3006 IF I<20 THEN 3010
3007 LET I=19
3010 DISP EXT$(U$,1,I)+": 1.Naeherung"      0006
3020 LET S0=S1=S2=S3=S4=S5=0
3030 FOR I=1 TO M STEP 1
3033 IF Y(I)<=0 THEN 3120
3040 LET X=X(I)
3050 LET Y=LOG(Y(I))
3060 LET S0=S0+1
3070 LET S1=S1+X
3080 LET S2=S2+X↑2
3090 LET S3=S3+Y
3100 LET S4=S4+Y↑2
3110 LET S5=S5+X*Y
3120 NEXT I      0035
3121 LET A=100
3122 LET K=-1
3125 IF S0<2 THEN 3180
3130 LET S6=S2-S1↑2/S0
3150 LET S8=S3-S1*S3/S0
3155 IF S6=0 THEN 3180
3156 IF LGT(ABS(S8))-LGT(ABS(S6))>99 THEN 3180
3160 LET K=S8/S6
3170 LET A=EXP((S3-K*S1)/S0)
3180 DISP I0,M,A,K      0125 0155 0156
3190 RETURN


5000 REM *** STEUERUNG ***      0220
5010 READ  3,U$ EOF 5250
5020 SCRATCH  4
5030 LET M1=M2=0
5040 READ  3,I$ EOF 5130      0080
5050 WRITE  4,I$
5060 LET M2=N2+1
5070 IF I$="B" THEN 5090
5080 GOTO 5040
5090 READ  3,I EOF 5130      0070 0120
5100 WRITE  4,I
5110 LET M1=M1+1
5120 GOTO 5090
5130 RESTORE  4      0040 0090
5140 SCRATCH  3
5150 FOR J=1 TO M2 STEP 1
5160 READ  4,I$
5170 WRITE  3,I$
5180 NEXT J
5190 FOR I=1 TO M1 STEP 1
5200 READ  4,I
5210 WRITE  3,I
5220 NEXT J
5230 DISP U$
```



```
5240 CHAIN U$
5250 END      0010


ENDE PROGRAMM FITEFM   ******
```

```
*****************************************************
*                                                   *
*  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,  *
*  LISTEN           steht am Sprungziel.             *
*                   Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe  *
*                   rechtsbuendig, hierbei werden " ;)," *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen  *
*                   Prioritaet benutzt.              *
*                                                   *
*****************************************************
```

```
PROGRAMM  F I T P O L                    Ausdruck vom 24.11.85
--------  -----------                    ---------------------
                                                   Seite  - 1 -

0010 REM *************** FITPOL ***********************
0020 REM
0030 REM
0040 REM ANPASSUNG AN POLYNOM
0050 REM

0080 REM ***********************************************
0090 FILES :PLDATA,:PLDAT3,:RETURN,:FLKHF
0100 DIM A(10,10), B(10,10), C(10,1), R(10,1), S(20),
                                        X(350), Y(350)
0110 DCL 80(18.U$)
0120 LET N0=0

0200 REM ***      0630
0210 LET G=0
0220 READ  :L0,I$,I0,I$ EOF 5000
0230 FOR I=1 TO 25 STEP 1
0240 READ  :X
0250 NEXT I
0255 LET L0=INT(L0)

0260 REM *** FN READ WERTEPAARE ***
0270 DEF FNR I,J
0280 READ  :X,I$ N I$,I$,I0
0290 FOR I  1 TO N STEP 1
0300 READ  :X(I),Y(I)
```

```
PROGRAMM FITPOL     24.11.85                    Seite  - 3 -

2170 NEXT I
2180 FOR I=1 TO M STEP 1
2190 FOR J=1 TO M STEP 1
2200 LET A(I,J)=S(I+J-1)
2210 NEXT J
2220 NEXT I
2230 MAT B=INV(A)
2240 MAT C=B*R
2250 LET S=0
2260 FOR I=1 TO M STEP 1
2270 LET F=0
2280 FOR J=1 TO M STEP 1
2290 LET F=F+C(J,1)*X(I)↑(J-1)
2300 NEXT J
2310 LET D=Y(I)-F
2320 LET S=S+D↑2
2330 NEXT I
2340 RETURN

5000 REM *** STEUERUNG ***      0220
5010 READ  3,U$ EOF 5250
5020 SCRATCH  4
5030 LET M1=M2=0
5040 READ  3,I$ EOF 5130      05090
5050 WRITE  4,I$
5060 LET M2=M2+1
5070 IF I$<>"0" THEN 5090
5080 GOTO 5040
5090 READ  3,I EOF 5130      05070 05120
5100 WRITE  4,I
5110 LET M1=M1+1
5120 GOTO 5090
5130 RESTORE  4      05040 05090
5140 SCRATCH  3
5150 FOR J=1 TO M2 STEP 1
5160 READ :4,I$
5170 WRITE  3,I$
5180 NEXT J
5190 FOR J=1 TO M1 STEP 1
5200 READ  4,I
5210 WRITE  3,I
5220 NEXT J
5230 DISP U$
5240 CHAIN U$
5250 END      05010

ENDE PROGRAMM FITPOL   ******
```

```
PROGRAMM FITPOL     24.11.85                    Seite  - 2 -

0310 NEXT I
0311 ON T0 GOTO 312,320
0312 FOR I=1 TO 26 STEP 1      0311
0313 READ :1,J
0314 NEXT I
0320 READ :1,I0,F      0311
0330 LET FN=1
0340 FNEND

0350 REM *** FNEND ***

0500 REM *** GOSUB 2000 & WRITE ↑ PLDAT2 *****      0630
0510 LET G=G+FNR
0520 IF INT(F)<>3 THEN 610
0521 LET M=F-INT(F)
0522 LET M=M*10      0523
0523 ON SGN(ABS(M-INT(M))) GOTO 522
0530 GOSUB 2000
0540 LET M0=M0+1
0550 IF M0>1 THEN 570
0560 SCRATCH  2
0570 WRITE  2,S,M      0550
0580 FOR I=1 TO M STEP 1
0590 WRITE :2,C(I,1)
0600 NEXT I

0610 REM *** FORTSETZUNG ***      0520
0620 READ :1,F
0630 ON F GOTO 200,500

2000 REM *** SUB ANPASSUNG FUER EINE KURVE ******      0530
2005 DISP "POLYNOM KURVE";G;" ↑ ";I$
2010 LET M=M+1
2020 LET M1=2*M-1
2030 MAT A=ZER(M,M)
2040 MAT B=ZER(M,M)
2050 MAT C=ZER(M,1)
2060 MAT R=ZER(M,1)
2070 FOR I=1 TO M1 STEP 1
2080 LET S(I)=0
2090 NEXT I
2100 FOR I=1 TO N STEP 1
2110 FOR J=1 TO M1 STEP 1
2120 LET X=X(I)↑(J-1)
2130 LET S(J)=S(J)+X
2140 IF J>M THEN 2160
2150 LET R(J,1)=R(J,1)+X*Y(I)
2160 NEXT J      02140
```

```
*****************************************************
*                                                   *
*  FORMATIERTES     0.... = Sprunganweisung,  *
*  LISTEN           steht am Sprungziel.             *
*                   Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe  *
*                   rechtsbuendig, hierbei werden " ;)," *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen  *
*                   Prioritaet benutzt.              *
*                                                   *
*****************************************************
```

```
PROGRAMM  P E E L 2                      Ausdruck vom 24.11.85
--------  =========                      ---------------------
                                                   Seite  - 1 -

0002 REM ***************** PEEL2 *********************
0004 REM
0006 REM
0008 REM PEELING FUER SUMME AUS 2 E-FUNKTIONEN

0009 REM                 Y=A*EXP(-a*X)+B*EXP(-b*X)
0010 REM

0012 REM ****************************************

0014 FILES :PLDATA,:FLKHF
0016 DCL 80 (I$,U$,U20)
0018 LET M0=0
0020 SCRATCH :2
0022 RESTORE :1

0024 REM ***      076
0026 READ :1,L0,U$,I0,I$ EOF 9000
0028 FOR I=1 TO 25 STEP 1
0030 READ :1,X
0032 NEXT I
0034 LET L0=INT(L0)

0036 REM *** FN READ WERTEPAARE ***
0038 DEF FNR
```

```
0040 READ  1.029.M.I8.I6.T0
0042 FOR I=1 TO M STEP 1
0044 READ  1.T(I).C(I)
0046 NEXT I
0048 ON T0 GOTO 50.56
0050 FOR I=1 TO 26 STEP 1      0048
0052 READ 1.J
0054 NEXT I
0056 READ  1.I8.F.F0      0048
0058 LET FN=F
0060 FNEND

0062 REM *** FNEND ***

0064 REM *** COSUB 100 & WRITE # #FLKMF *****      0076
0066 IF FNK<>4 THEN 74
0067 ON T0 GOTO 74.68
0068 GOSUB 100      0067
0070 LET M0=M0+1
0072 WRITE  2.B0.B1.C0.C2.U1.-U2.U3.-U4

0074 REM *** FORTSETZUNG ***      0066 0067
0076 ON F0 GOTO 24.64
0078 STOP
0100 REM BEGIN PEELING      0068
0110 REM WEICHTING ?  -- I(I)=C(I) IM 197. 0/I(I) IM 5210
0130 DIM C(350).T(350).I(350)
0180 ON SGN(M-4)+1 GOTO 195.196
0190 RETURN
0195 GOSUB 6000      0180
0196 FOR I=1 TO M STEP 1      0180
0197 LET I(I)=C(I)
0198 NEXT I
5000 REM INITIAL PARAM.-ESTIMATES BY 'PEELING'
5001 DISP "PEELING"
5003 LET B2=C2=0
5004 FOR I=1 TO M STEP 1
5005 IF C(I)>0 THEN 5008
5006 LET C2=C2+1
5007 LET C(I)=1/C2
5008 NEXT I      0005
5010 LET M1=1
5011 LET C8=9.999999999999E99
5015 LET A3=A4=A5=A6=B8=0      0280
5016 LET T=9E99
5020 LET M2=M1+1
5030 FOR I=M TO M-M1 STEP -1
5031 IF T<T(I) THEN 5036
5032 LET T=T(I)
```



```
5033 LET B8=B8+1
5036 LET C=LOG(C(I))      0031
5040 LET A3=A3+T(I)*C
5045 LET A4=A4+T(I)
5050 LET A5=A5+C
5060 LET A6=A6+T(I)↑2
5065 NEXT I
5066 IF B8<2 THEN 5270
5070 LET A7=A5/M2
5075 LET A8=A4/M2
5080 LET U4=(A3-A4*A5/M2)/(A6-A4↑2/M2)
5085 LET U3=A7-U4*A8
5090 LET A3=A4=A5=A6=B3=B8=B9=0
5091 LET T=9E99
5095 FOR I=M-M2 TO 1 STEP -1
5100 LET B2=EXP(U3+U4*T(I))
5102 IF C(I)<=A2 THEN 5150
5104 LET B9=B9+1
5106 IF T=T(I) THEN 5115
5108 LET T=T(I)
5110 LET B8=B8+1
5115 LET C=LOG(C(I)-A2)      0<5106
5120 LET A3=A3+T(I)*C
5130 LET A4=A4+T(I)
5135 LET A5=A5+C
5140 LET A6=A6+T(I)↑2
5150 NEXT I      0<5102
5151 LET U3=EXP(U3)
5152 IF B8>1 THEN 5160
5153 LET U3=U3
5154 LET U2=U4
5155 LET U3=U3/100
5156 LET U4=U4/100
5157 GOTO 5193
5160 LET B2=B3=1      0<5152
5165 LET A7=A5/B9
5170 LET A8=A4/B9
5175 LET U2=(A3-A4*A5/B9)/(A6-A4↑2/B9)
5180 LET U1=A7-U2*A8
5185 LET U1=EXP(U1)
5195 LET C9=0      0<5157
5200 FOR I=1 TO M STEP 1
5205 LET C4=U1*EXP(U2*T(I))+U3*EXP(U4*T(I))
5210 LET C9=C9+(C(I)-C4)/I(I)↑2
5220 NEXT I
5221 DISP "PEELING: C9 =";C9;TAB(30);"EF";CHR$(49+B3)
5230 IF C9>C8 THEN 5270
5235 LET C8=C9
5236 LET B0=B9
5237 LET B1=B8
5240 LET V1=U1
5245 LET V2=U2
```



```
5250 LET U3=U3
5255 LET U4=U4
5270 LET M1=M1+1      0<5066 0<5236
5280 IF M1<M THEN 5015
5337 RETURN
6000 REM AUS 4 NACH 6      0195
6010 DISP " AUS 4 NACH 6"
6020 MAT G=ZER(2.2)
6025 FOR J=0 TO 3 STEP 3
6030 FOR I=1 TO 2 STEP 1
6040 LET G(I.1)=1
6050 LET G(I.2)=T(I+J)
6060 LET U(I.1)=LOG(C(I+J))
6070 NEXT I
6080 MAT A=INV(G)
6090 LET D=DET
6100 FOR S=1 TO 2 STEP 1
6110 MAT A=G
6120 FOR Z=1 TO 2 STEP 1
6130 LET A(Z.S)=U(Z.1)
6140 NEXT Z
6150 MAT A=INV(A)
6160 LET V(S)=DET/D
6170 NEXT S
6180 LET N=N+1
6200 FOR I=M TO 3+J STEP -1
6210 LET T(I)=T(I-1)
6220 LET C(I)=C(I-1)
6230 NEXT I
6240 LET X=T(2+J)=(T(1+J)+T(3+J))/2
6250 LET C(2+J)=EXP(V(1)+V(2)*X)
6260 NEXT J
6265 WRITE  2.M
6270 FOR I=1 TO M STEP 1
6272 BUILD J8.I
6274 IF (I<>2) AND (I<>5) THEN 6280
6276 LET J8=J8+"(berechnet)"
6280 WRITE  2.J8.T(I).C(I)      0<6274
6290 NEXT I
6300 RETURN

9000 REM *** CHAIN FITEF2 ***      026
9010 DISP "CHAIN FITEF2"
9020 CHAIN "FITEF2"
9110 END

END PROGRAMM PEEL2  ******
```

```
+
=  FORMATIERTES      8.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,
=  LISTEN:           steht am Sprungziel.
+  ------------      Bei 'LINE OVERFLOW' Rasterzeichenausgabe
+                    rechtsbuendig; hierbei werden " ;," .
+                    als Trennzeichen in der angegebenen
+                    Prioritaet benutzt.
+
```

PROGRAMM F I T E F 2 Ausdruck von 24.11.
========= =========== ----------
Seite - 1

```
0002 REM ************** FITEF2 ******************
0004 REM
0006 REM
0008 REM ANPASSUNG AN SUMME AUS 2 E-FUNKTIONEN.

0009 REM              Y=A*EXP(-a*X)+B*EXP(-b*X)
0010 REM

0012 REM ****************************************

0014 FILES #PLDATA;#PLDAT4;#RETURN;#FLKMF
0016 DCL 80 (I8.U16.U24)
0018 LET M0=0
0020 SCRATCH :2
0022 RESTORE :1

0024 REM ***      002
0026 READ :1.L0.U16.I8.I0 EOF 9000
0028 FOR I=1 TO 25 STEP 1
0030 READ :1.X
0032 NEXT I
0034 LET L0=INT(L0)

0036 REM *** FN READ WERTEPAARE ***
0038 DEF FNR
```

```
0040 READ  1.02$.N.I$.T0
0041 ON T0 GOTO 50.42
0042 FOR I=1 TO N STEP 1      041
0044 READ `1.T(I).C(I)
0046 NEXT I
0048 GOTO 56
0050 FOR I=1 TO 2+N+26 STEP 1      041
0052 READ  1.J
0053 IF I<=2+N THEN 55
0054 WRITE `2.J
0055 NEXT I      053
0056 READ `1.I$.F.F0      048
0058 LET FN=F
0060 FNEND

0062 REM *** FNEND ***

0064 REM *** GOSUB 160 & WRITE > PLOAT4 *****      082
0066 IF FNR<>4 THEN 80
0067 ON T0 GOTO 80.68
0068 GOSUB 100      067
0070 LET M4=M4+1
0072 WRITE  2.Z0.M0.M7.M6.M5.P9.E9.S0.M.M
0074 FOR I=1 TO M STEP 1
0076 WRITE  2.U(I.1).O(I).V(I).K(I)
0078 NEXT I

0080 REM *** FORTSETZUNG ***      066 067
0082 ON F0 GOTO 24.64
0084 STOP
0100 REM BEGIN REGRESSION      068
0110 REM WEIGHTING ?  -- I(I)=C(I) IM 197. 8/I(I) IM
                                    1830,2050,2230,2260,3210
0130 DIM
     A(30,4).B(4.1).C(30).E(30.1).F(30.1).K(4).O(4).Q(4.1)
                                                .R(8).S(4).T(30)
0140 DIM
     U(4.1).V(4).W(4.1).X(4.1).Y(4.1).D(4.30).G(4.4).H(4.30)
                                                .L(4.4).Z(30.1)
0150 DIM J(4.4).P(4.4).I(30)
0160 RESTORE
0170 DATA 4.1E-6.1E-9.100.30..01
0173 READ M.D9.D5.M9.M5.E9
0176 FOR I=1 TO M STEP 1
0177 LET U(I.1)=O(I)=V(I)=K(I)=9E99
0178 NEXT I
0180 ON SGN(M-M)+1 GOTO 195.196
0185 GOSUB 5000
0190 RETURN
```



```
0195 GOSUB 6000      0100
0196 FOR I=1 TO M STEP 1      0100
0197 LET I(I)=C(I)
0198 NEXT I
0200 MAT Z=ZER(M.1)
0210 MAT F=ZER(M.1)
0220 MAT U=ZER(M.1)
0230 MAT Q=ZER(M.1)
0250 MAT W=ZER(M.1)
0260 MAT X=ZER(M.1)
0270 MAT Y=ZER(M.1)
0280 GOSUB 5000
0285 IF B2=1 THEN 290
0286 REM RETURN
0290 REM ESTABLISHING THE PARAMETER SPACE LIMIT VECTORS
                                                      0285
0300 FOR I=1 TO M STEP 1
0310 LET R(I)=U(I.1)/10
0320 LET U(I+M)=10*U(I.1)
0330 NEXT I
0335 PRINT U$.U2$
0340 PRINT "STARTING ESTIMATES FOR THE ITERATIONS","M =";M
0350 PRINT "A","a","B","b","SS"
0360 LET Z0=M8+M7-M6+0
0365 LET P9=-9E99
0370 REM BEGIN OF ITERATION
0380 LET Z0=Z0+1      01110 01925
0385 DISP "ITERATION";Z0
0400 LET C1=.5
0410 REM CORRECTION VECTOR BY GAUSS-NEWTON
0440 GOSUB 2000
0444 IF Z0>1 THEN 430
0445 PRINT U(1.1).U(2.1).U(3.1).U(4.1).Q0
0450 LET S0=S(1)=Q0      0444
0460 MAT Q=U
0470 IF S(1)<=0 THEN 1170
0480 GOSUB 2200
0490 MAT B=ZER(M.1)
0500 MAT D=ZER(M.M)
0510 MAT G=ZER(M.M)
0520 MAT H=ZER(M.M)
0530 MAT L=ZER(M.M)
0540 MAT O=TRN(A)
0550 MAT G=D*O
0560 GOSUB 8000
0561 IF S1=0 THEN 570
0562 LET M6=M6+1
0564 LET Z0=Z0-1
0565 LET H0=S0/(M-M)
0566 FOR I=1 TO M STEP 1
0567 LET U(I)=U(I.1)+H0
0568 NEXT I
```



```
0569 ON SGN(M6+Z0-M9)+2 GOTO 1300.1300.1935
0570 MAT H=L*D      0561
0580 MAT B=H*E
0590 GOSUB 3000
0600 LET Z9=0
0620 REM IMPROVE CORRECTION-VECTOR BY HARTLEY'S      01150
0630 LET Z9=Z9+1
0635 DISP "ITERATION";Z0."HARTLEY";Z9
0640 FOR I=1 TO M STEP 1
0650 LET U(I.1)=Q(I.1)+C1*B(I.1)
0660 NEXT I
0670 MAT W=U
0680 GOSUB 2000
0690 LET S(2)=Q0
0700 IF S(2)<=0 THEN 1170
0710 FOR I=1 TO M STEP 1
0720 LET U(I.1)=Q(I.1)+2*C1*B(I.1)
0730 NEXT I
0740 MAT X=U
0750 GOSUB 2000
0760 LET S(3)=Q0
0770 IF S(3)<=0 THEN 1170
0780 ON SGN(S(3)-2*S(2)+S(1))+2 GOTO 790.790.810
0790 LET V0=.23      0700 0780
0800 GOTO 830
0810 LET V0=.5+(S(1)-S(3))/(4*(S(3)-2*S(2)+S(1)))      0780
0830 MAT B=(V0)*B      0800
0840 GOSUB 3000
0850 MAT U=Q+B
0860 MAT Y=U
0870 GOSUB 2000
0880 LET S(4)=Q0
0890 IF S(4)<=0 THEN 1170
0900 REM SELECT POINT WITH SMALLEST SUM OF SQUARES
0910 LET D1=S(1)-S(4)
0920 ON SGN(D1)+2 GOTO 930.930.950
0930 LET D1=S(1)-S(2)      0920 0920
0940 ON SGN(D1)+2 GOTO 990.990.970
0950 LET D1=S(3)-S(4)      0920
0960 ON SGN(D1)+2 GOTO 970.970.1010
0970 LET D1=S(2)-S(3)      0940 0960 0960
0980 ON SGN(D1)+2 GOTO 1040.1040.1070
0990 LET D1=S(1)-S(3)      0940 0940
1000 ON SGN(D1)+2 GOTO 1120.1120.1070
1010 LET D1=S(4)-S(2)      0960
1020 LET S0=S(4)
1030 IF D1<0 THEN 1090
1040 MAT U=W      0980 0980
1050 LET S0=S(2)
1060 GOTO 1090
1070 MAT U=X      0980 01000
1080 LET S0=S(3)
```



```
1090 LET P9=(S(1)-S0)/S(1)      01030 01060
1100 ON SGN(P9-D9)+2 GOTO 1170.1170.1110
1110 ON SGN(M9-Z0)+2 GOTO 1170.1170.380      01100
1120 MAT U=0      01080 01090
1130 ON SGN(15-Z9)+2 GOTO 1170.1170.1140
1140 LET C1=.25*C1      01130
1150 GOTO 620
1170 REM END OF ITERATION      0470 0700 0770 0890 01100
                               01100 01110 01110 01130 01130

1171 REM GOSUB STATISTICS
1175 GOSUB 3200
1300 REM CHECK FOR MULTIPLE MINIMA      0569 0569
1301 LET M8=M8+1
1302 LET S9=S0
1303 LET L8=1
1310 PRINT "LATTICE SEARCH";M8;" ITER";Z0;" CONV =",P9;
1311 IF S1=0 THEN 1314
1312 PRINT " SING.MAT";M6;" DET =";D;
1314 PRINT "  L8 =";L8      01311
1315 PRINT U(1.1).U(2.1).U(3.1).U(4.1).S0
1320 LET P0=P9=0
1325 MAT X=U
1330 FOR J=1 TO 100 STEP 1
1335 DISP "J=";J;" P0=";P0;" S0=";S0;P9
1340 FOR I=1 TO M STEP 1
1342 LET S(I)=U(I.1)+(J/10)
1343 IF V(I)=9E99 THEN 1330
1345 LET S(I)=V(I)+(J/10)
1350 NEXT I      01343
1400 FOR I1=-1 TO 1 STEP 1/L8
1405 LET U(1.1)=X(1.1)+I1*S(1)
1410 IF U(1.1)<=0 THEN 1890
1500 FOR I2=-1 TO 1 STEP 1/L8
1505 LET U(2.1)=X(2.1)+I2*S(2)
1510 IF U(2.1)<=0 THEN 1895
1600 FOR I3=-1 TO 1 STEP 1/L8
1605 LET U(3.1)=X(3.1)+I3*S(3)
1610 IF U(3.1)<=0 THEN 1880
1700 FOR I4=-1 TO 1 STEP 1/L8
1705 LET U(4.1)=X(4.1)+I4*S(4)
1710 IF U(4.1)<=0 THEN 1875
1800 LET Q0=0
1805 FOR I=1 TO M STEP 1
1806 LET A0=U(2.1)*Y(I)
1807 LET A1=U(4.1)*Y(I)
1808 IF (A0>210) OR (U(3.1)<1E-6) THEN 1875
1809 IF (A1>210) OR (U(3.1)<1E-6) THEN 1875
1810 LET A0=U(1.1)*EXP(-A0)
1815 LET A1=U(3.1)*EXP(-A1)
1820 LET F(I.1)=A0+A1
1825 IF ABS(F(I.1))>ABS(C(I)*9E49) THEN 1875
1830 LET Q0=Q0+(C(I)-F(I.1))*I(I)↑2
```

```
1040 IF Q8>=S0 THEN 1075
1045 NEXT I
1050 BEEP
1055 LET S0=Q8
1060 MAT Y=U
1065 LET P0=P0+1
1066 LET P9=(S9-S0)/S9
1070 DISP "J=";J," P0=",P0," S0=",S0,P9
1075 NEXT I4     01710 01008 01009 01025 01040
1080 NEXT I3     01610
1085 NEXT I2     01510
1090 NEXT I1     01410
1095 NEXT J
1900 IF P0=0 THEN 1930
1905 MAT U=Y
1911 LET M7=M7+P0
1915 IF (N0>N5) OR (P9<D5) THEN 1935
1920 PRINT "NEW STARTING ESTIMATES","MIN.SS:";P0;M7,"CONV
                                                    =";P9
1925 GOTO 3600
1930 MAT U=X     01900
1935 REM RETURN AND WRITE ESTIMATION TO +PLDAT4     0569
                                                    01915
1936 PRINT "MIN.SS:",P0,M7,"CONV =";P9
1937 PRINT U(1,1),U(2,1),U(3,1),U(4,1),S0
1938 PRINT TAB(37);"********"
1939 PRINT
1940 RETURN
2000 REM DEF MODEL AND COMP WEIGHTED SUM OF SQUARES
                                    0440 0600 0750 0870 02235 03204
2005 LET Q8=0
2030 FOR I=1 TO M STEP 1
2035 LET A0=U(1,1)*EXP(-U(2,1)*T(I))
2040 LET A1=U(3,1)*EXP(-U(4,1)*T(I))
2045 LET F(I,1)=A0+A1
2050 LET Q8=Q8+(C(I)-F(I,1))/I(I))↑2
2060 NEXT I
2065 RETURN
2200 REM PARTIAL DERIVATIVES APPROXIMATED BY DIFFERENCE
                                          EQUATIONS     0400 03206
2205 REM AND DEF OF MATRIX
2210 MAT Z=F
2215 MAT A=ZER(N,M)
2220 MAT E=ZER(M,1)
2225 FOR J=1 TO M STEP 1
2230 LET U(J,1)=(1+E9)*U(J,1)
2235 GOSUB 2000
2240 LET D8=E9*U(J,1)
2245 FOR I=1 TO M STEP 1
2250 LET E(I,1)=(C(I)-F(I,1))/I(I)
2255 LET F(I,1)=(F(I,1)-Z(I,1))/D8
2260 LET A(I,J)=F(I,1)/I(I)
```



```
2265 NEXT I
2270 LET U(J,1)=U(J,1)/(1+E9)
2275 NEXT J
2280 RETURN
3000 REM CONSTRAINE CORRECTION VECTOR     0590 0840
3005 FOR I=1 TO M STEP 1
3010 LET C0=U(I,1)*B(I,1)-R(I)
3015 ON SGN(C0)+2 GOTO 3020,3035,3035
3020 LET R1=(R(I)-U(I,1))/B(I,1)     03015
3025 LET A9=.00001
3030 GOTO 3055
3035 LET C0=U(I,1)*B(I,1)-R(I+M)     03015 03015
3040 ON SGN(C0)+2 GOTO 3060,3045
3045 LET R1=(R(I+M)-U(I,1))/B(I,1)     03040
3050 LET A9=-.00001
3055 LET B(I,1)=R1+B(I,1)*A9     03030
3060 NEXT I     03040 03040
3065 RETURN
3100 REM DETERMINE STATISTICS OF ESTIMATION     01175
3200 GOSUB 2000
3205 DISP U(1,1);U(2,1);U(3,1);U(4,1);Q8
3206 GOSUB 2200
3210 MAT F=Z
3215 MAT D=TRN(A)
3220 MAT G=D*A
3225 GOSUB 8000
3230 LET M0=S0/(N-M)
3235 FOR I=1 TO M STEP 1
3236 IF L(I,1)<0 THEN 3245
3240 LET Q(I)=SQR(L(I,1)*M0)
3245 NEXT I     03236
3250 LET M1=N-M
3255 LET T9=(1.96*M1+6.8033+.9591/M1)/(M1-.90259+.11500/M1)
3260 LET M9=2*M*M1/(M+M1)
3265 LET F9=1.6449/SQR(M9-.95)-.7863*(1/M-1/M1)
3270 LET F9=EXP(2*F9)
3275 LET F9=SQR(F9*M)
3280 FOR I=1 TO M STEP 1
3281 IF L(I,1)<0 THEN 3295
3285 LET K(I)=Q(I)*F9
3290 LET U(I)=Q(I)*T9
3295 NEXT I     03281
3300 RETURN
5000 REM READ INITIAL ESTIMATES     0200
5010 READ :4,B2,B8,B9,C8,C2,U(1,1),U(2,1),U(3,1),U(4,1)
5200 PRINT
5205 IF B2>0 THEN 5207
5206 PRINT "ONLY ";
5207 IF B9>1 THEN 5332     05205
5208 PRINT "SINGLE EFUN",
5332 PRINT "C8 =";C8     05207
5335 IF C2=0 THEN 5337
```



```
5336 PRINT ."negative Messwerte wurden = 1/i[mag] gesetzt!"
5337 RETURN     05335
5800 REM     0185
5810 FOR I=1 TO M STEP 1
5830 LET U(I,1)=Q(I)*K(I)+U(I)*9E99
5840 NEXT I
5850 LET Z0=N8*M7+N6*N5*P9*E9*S0*9E99
5855 PRINT
5856 PRINT "BILD ","""+U18+""
5857 PRINT " KURVE ","""+U28+""
5858 PRINT "     *****     Keine Anpassung an doppp.
                                          E-Funktion!     *****"
5859 PRINT
5860 RETURN
6000 REM AUS 4 MACH 6     0195
6265 READ :4,N
6270 FOR I=1 TO N STEP 1
6275 READ :4,J8,T(I),C(I)
6280 PRINT J8,T(I),C(I)
6290 NEXT I
6300 RETURN
8000 REM MAT L=INV(C)     0560 03225
8010 IF M=4 THEN 8040
8020 STOP
8040 FOR Z=1 TO 4 STEP 1     08010
8050 FOR S=1 TO 4 STEP 1
8060 LET Z1=0
8070 FOR J=1 TO 4 STEP 1
8080 IF J=Z THEN 8160
8090 LET Z1=Z1+1
8100 LET S1=0
8110 FOR I=1 TO 4 STEP 1
8120 IF I=S THEN 8130
8130 LET S1=S1+1
8140 LET L(Z1,S1)=G(J,I)
8150 NEXT I     08120
8160 NEXT J     08080
8170 LET J(S,Z)=(-1)↑(Z+S)*FND
8180 NEXT S
8190 NEXT Z
8200 LET D=FNU
8220 LET S1=1
8230 IF D=0 THEN 8995
8240 LET S1=0
8250 LET Z1=LGT(ABS(D))
8260 FOR Z=1 TO 4 STEP 1
8270 FOR S=1 TO 4 STEP 1
8275 IF J(Z,S)=0 THEN 8290
8280 IF ABS(LGT(ABS(J(Z,S)))-Z1)>99 THEN 8330
8290 LET L(Z,S)=J(Z,S)/D     08275
8300 LET J(Z,S)=0
8310 GOTO 8330
```



```
8320 LET J(Z,S)=S1*1     08280
8330 NEXT S     08310
8340 NEXT Z
8365 RETURN
8400 REM DET (4,4)
8410 DEF FNU D,J,Z,I,S
8420 LET D=0
8430 FOR J=1 TO 4 STEP 1
8440 LET Z=0
8450 FOR I=1 TO 4 STEP 1
8460 IF I=J THEN 8510
8470 LET Z=Z+1
8480 FOR S=2 TO 4 STEP 1
8490 LET L(Z,S-1)=G(I,S)
8500 NEXT S
8510 NEXT I     08460
8520 LET D=D+(-1)↑(J+1)*G(J,1)*FND
8530 NEXT J
8540 LET FN=D
8550 FNEND
8600 REM DET (3,3)
8610 DEF FND D,J,Z,I,S
8620 LET D=0
8630 FOR J=1 TO 3 STEP 1
8640 LET Z=0
8650 FOR I=1 TO 3 STEP 1
8660 IF I=J THEN 8710
8670 LET Z=Z+1
8680 FOR S=2 TO 3 STEP 1
8690 LET H(Z,S-1)=L(I,S)
8700 NEXT S
8710 NEXT I     08660
8720 LET D=D+(-1)↑(J+1)*L(J,1)*(H(1,1)*H(2,2)-H(2,1)*H(1,2))
8730 NEXT J
8740 LET FN=D
8750 FNEND
8995 RETURN     08230

9000 REM *** STEUERUNG ***     026
9010 READ :3,U18 EOF 9250
9020 SCRATCH :4
9030 LET M1=M2=0
9040 READ :3,I8 EOF 9130     09000
9050 WRITE :4,I8
9060 LET M2=M2+1
9070 IF I8="0" THEN 9090
9080 GOTO 9040
9090 READ :3,I EOF 9130     09070 09120
9100 WRITE :4,I
9110 LET M1=M1+1
9120 GOTO 9050
```

```
PROGRAMM FITEF2    24.11.85                    Seite  - 10 -


9130 RESTORE  4      09040 09090
9140 SCRATCH :3
9150 FOR J=1 TO M2 STEP 1
9160 READ  :4,I$
9170 WRITE  3,I$
9180 NEXT J
9190 FOR J=1 TO M1 STEP 1
9200 READ  4,I
9210 WRITE  3,I
9220 NEXT J
9230 DISP U1$
9240 CHAIN U1$
9250 END      09010


***  ENDE PROGRAMM FITEF2   ******
```

```
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
=                                                             +
+  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,    +
+  LISTEN:          steht an Sprungziel.                      +
+  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe    +
+                   rechtsbuendig; hierbei werden " ;)," als  +
+                   als Trennzeichen in der angegebenen       +
+                   Prioritaet benutzt.                       +
+                                                             +
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```

```
PROGRAMM  P L O T 0                    Ausdruck vom 24.11.85
--------  =========                    ---------------------
                                                Seite  - 1 -


0010 REM ******************** PLOT0 ******************
0020 REM                        -----
0030 REM
0040 REM VORBEREITUNG D. BESCHRIFTUNG FUER KOORD.-KREUZ


0050 REM ***************************************
0060 DIM A(2,350), C(10), I(32), I$(40)
0070 DCL $0(16,U6), 32(X$,X10,Y$,Y10)
0080 FILES *PLDATA,*RETURN:*PLDAT0:*FLKHF
0085 SCRATCH :3
0090 LET A0=0


0100 REM ***      0710
0110 READ :1,X,U$,X6,Y6,X1,X2,T1,Y1,Y2,T2 EOF 5000
0120 READ
       1,B,M,A1,A2,D1,D2,A3,B2,M2,B3,M3,X0,X9,M1,Y0,Y9,M2,X5,
                                                          X6
0130 LET G=0
0140 LET A0=A0+1
0141 DISP "PLOT0 -> BILD",A0
0145 LET L1=INT(X/10)+1
0150 ON L1 GOTO 152,151
0151 LET X=X-10      0150
0152 LET L0=INT(X)      0150
0155 LET T0$="WIE TA0.1"
```

```
PROGRAMM PLOT0    24.11.85                    Seite  - 2 -


0160 REM *** FN READ WERTEPAARE ***
0170 DEF FNR 1,J
0180 READ  1,U$,M,X10,Y10,T0
0190 FOR  I=1 TO M STEP 1
0200 READ  1,A(1,I),A(2,I)
0210 NEXT I
0211 ON T0 GOTO 212,220
0212 FOR I=1 TO 26 STEP 1      0211
0213 READ  1,J
0214 NEXT I
0220 READ :1,26,F,F0      0211
0230 LET FN=*1
0240 FNEND


0250 REM *** FNEND ***


0500 REM *** UEBERSCHRIFT ******
0510 WRITE  3,7,"","",""
0520 BUILD I$,A0
0530 WRITE :3,"Abbildung"+I$
0540 LET I$=""
0550 PAD I$,35
0560 WRITE  3,I$
0570 WRITE  3,"",U$
0580 LET I$=""
0590 FOR I=1 TO LEN(U$) STEP 1
0600 LET I$=I$+""""
0610 NEXT I
0630 WRITE  3,I$


0640 REM *** READ & out1. GOSUB  KOORD.KREUZ ***      0710
0650 LET G=G+FNR
0655 IF G>1 THEN 690
0660 GOSUB 2000


0690 REM *** FORTSETZUNG ***      0655
0710 ON INT(F0) GOTO 100,640


2000 REM *** SUB KOORD.KREUZ   ******      0660
2080 DATA .14,.16,.1,.1
2085 RESTORE
2090 READ B1,M1,B9,M9
2100 WRITE :3,B1,M1,B9,M9
2110 REM CSIZE B1,M1,0
2120 FOR I=Y1 TO Y2 STEP T2
2130 BUILD I$,1
2140 LET I$=REP$(I$," ","",-1,1)+"-"
```

```
PROGRAMM PLOT0    24.11.85                    Seite  - 3 -


2150 REM MOVE X5-(LEN(I$)-.3)*B1+M1,I-M1*.3*M2
2151 WRITE :3,X5-(LEN(I$)-.3)*B1+M1,I-M1*.3*M2
2160 WRITE :3,I$
2170 NEXT I


2180 REM *** MARK. XAXIS ****
2190 .00.00
2200 :00.00???
2210 LET D0=6*B1*M1
2220 LET X3=X1
2230 LET X4=X2
2240 ON L0 GOTO 2270,2250,2250
2250 LET
     X3=SGN(X3)*INT(ABS(X3))+(SGN(SGN(X3)-1)+1)
                          *SGN(ABS(X3-INT(X3)))      02240 02240
2260 LET
     X4=SGN(X4)*INT(ABS(X4))+(SGN(SGN(X4)+1)-1)
                          *SGN(ABS(X4-INT(X4)))
2265 LET D0=0
2270 LET T=(X4-X3)/T1+1      02240


2280 REM *** BUILD MARK.
2290 FOR I=1 TO T STEP 1
2300 LET U=X+X3+(I-1)*T1
2310 ON L0 GOTO 2330,2320,2320
2320 LET U=100U      02310 02310
2330 ON I GOTO 2380      02310
2340 LET D=ABS(X-D1)
2350 IF D>=D0 THEN 2380
2360 LET I$(I)=""
2370 GOTO 2600
2380 LET D1=X      02330 02350
2390 IF L0=2 THEN 2580
2400 IF (U<.1) AND (U>0) THEN 2500
2410 IF U>=1E4 THEN 2500
2420 IF ABS(U)>=1 THEN 2500
2430 IF U<30 THEN 2460
2440 LET I$="0"
2450 GOTO 2590
2460 BUILD USING 2470,I$,U      02430
2470 :00.000
2480 GOTO 2590
2500 LET I2$="00.00"      02420
2510 FOR I1=1 TO 2 STEP 1
2520 IF ABS(U)<10*(1-5*10*(I1-4) THEN 2560
2530 LET I2$=REP$(I2$,".0","0.",1,1)
2540 NEXT I1
2550 LET I2$="00000"
```

```
2360 BUILD USING [28,I18,U      #2320
2370 GOTO 2590
2380 BUILD USING 2200,I18,U     #2390 #2400 #2410
2390 LET I$(I)=REP$(REP$(I18," ","",-1,1),"!.#E","E",1,1)
                                                  #2430 #2490 #2370
2400 NEXT I      #2370


2410 REM *** CPLOT MARK.
2420 FOR I=1 TO T STEP 1
2430 IF I$(I)="" THEN 2730
2440 LET X=X3+(I-1)*T1
2450 REM MOVE X,Y1
2460 WRITE  3,X,Y1


2480 REM PLOT X,Y1-B1*.6*M2
2481 WRITE  3,X,Y1-B1*.6*M2
2470 LET I18=I$(I)
2480 LET J=SCN(I18,"E",1,1)
2490 ON J+1 GOTO 2730,2720
2700 LET I18=EXT$(I18,1,J-1)+"*10"
2710 GOTO 2730
2720 LET I18="*10"      #2690


2730 REM MOVE X-LEN(I18)/2*B1*M1,Y1-(H1+B1*.6)*M2      #2690
                                                       #2710
2731 WRITE  3,X-LEN(I18)/2*B1*M1,Y1-(H1+B1*.6)*M2
2740 REM CPLOT I18
2741 WRITE  3,I18
2750 NEXT I      #2630
2755 WRITE  3,9E99,9E99


2760 REM *** CPLOT EXP
2770 REM CSIZE B9,H9,0
2780 FOR I=1 TO T STEP 1
2790 IF I$(I)="" THEN 2920
2800 LET I18=I$(I)
2810 LET J=SCN(I18,"E",1,1)
2820 ON J+1 GOTO 2920
2830 LET I18=EXT$(I18,J+1,LEN(I18))
2840 LET I18=REP$(I18,"0","",1,1)
2850 LET I18=REP$(I18,"+","",1,1)
2860 LET X=X3+(I-1)*T1
2870 LET J1=1
2880 ON J GOTO 2900
2890 LET J1=(LEN(I$(I))-1)/2


2900 REM MOVE X+J1*B1*M1,Y1-(H9+B1*.6)*M2      #2880
```



```
2901 WRITE :3,X+J1*B1*M1,Y1-(H9+B1*.6)*M2
2910 REM CPLOT I18,X
2911 WRITE :3,I18
2920 NEXT I      #2790 #2820
2925 WRITE :3,9E99,9E99


2930 REM *** ZUSATZ LOG.ACHSE
2940 ON L0 GOTO 3100,2950,2950
2950 DATA 2,2,3,3,4," ",3,3,6," ",7,7,8," ",9," "      #2940
                                                       #2940

2960 FOR J=X3-1 TO X4+1 STEP 1
2970 RESTORE
2971 READ I,I,I,I
2980 FOR I=1 TO 8 STEP 1
2990 READ I1,I18
3000 LET X=LGT(I1)*J
3010 IF (X<X1) OR (X>X2) THEN 3060
3020 REM MOVE X,Y1
3021 WRITE :3,X,Y1


3030 REM PLOT X,Y1-B1*.3*M2
3031 WRITE :3,X,Y1-B1*.3*M2


3040 REM MOVE X-B9*.3*M1,Y1-(B1*.3+H9)*M2
3041 WRITE :3,X-B9*.3*M1,Y1-(B1*.3+H9)*M2
3050 REM CPLOT I18
3051 IF X-J>3*B9*M1 THEN 3053
3052 LET I18=" "
3053 WRITE :3,I18      #3051
3060 NEXT I      #3010
3070 NEXT J
3075 WRITE :3,9E99,9E99


3080 REM *** FN KLEINBUCHST. MACH GROSSBUCHST.  ******
3090 DEF FNC$(I$)I,L
3091 DCL 32 FN$*
3092 IF I$="" THEN 3160
3100 CONVERT I$ TO I LENGTH L
3110 FOR I=1 TO L STEP 1
3120 IF (I(I)<97) OR (I(I)>122) THEN 3140
3130 LET I(I)=I(I)-32
3140 NEXT I      #3120
3150 CONVERT I TO I$ LENGTH L
3160 LET FN$=I$      #3092
3170 FNEND


3180 REM *** TEXT ACHSEN ***      #2940
```



```
3190 RESTORE
3191 FOR I=1 TO 28 STEP 1
3192 READ ,I$
3193 NEXT I
3200 DATA ,25,,25
3201 READ B1,H1
3210 REM CSIZE B1,H1,0
3211 WRITE  3,B1,H1
3220 LET X$=REP$(X$,T$$,X18,1,1)


3230 REM MOVE X2-LEN(X$)*B1-  Y$
3231 WRITE :3,X2-LEN(X$)*B1  : Y$
3240 REM CPLOT FNC$(X$)
3241 WRITE :3,FNC$(X$)
3260 REM CSIZE B1,H1,PI/2
3270 LET Y$=REP$(Y$,T$$,Y18,1,1)


3280 REM MOVE X0+H1*.6*M1-[illegible]EN(Y$)*B1*M2
3281 WRITE  3,X0+H1*.6*M1-[illegible]LEN(Y$)*B1*M2
3290 REM CPLOT FNC$(Y$),2
3291 WRITE  3,FNC$(Y$)
3300 RETURN


5000 REM *** STEUERUNG ***      #110
5010 READ  2,U$ EOF 5250
5020 SCRATCH  4
5030 LET M1=M2=0
5040 READ  2,I$ EOF 5130      #5000
5050 WRITE  4,I$
5060 LET M1=M1+1
5070 IF I$="0" THEN 5090
5080 GOTO 5040
5090 READ  2,I EOF 5130      #5070 #5120
5100 WRITE  4,I
5110 LET M1=M1+1
5120 GOTO 5090
5130 RESTORE  4      #5040 #5090
5140 SCRATCH  2
5150 FOR J=1 TO M2 STEP 1
5160 READ  4,I$
5170 WRITE  2,I$
5180 NEXT J
5190 FOR J=1 TO M1 STEP 1
5200 READ  4,I
5210 WRITE  2,I
5220 NEXT J
5230 DISP U$
5240 CWAIN U$
5250 END      #5010
```

```
++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
+                                                          +
+  FORMATIERTES    B.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,  +
+  LISTEN:         steht am Sprungziel.                    +
+  ------------    Bei "LINE OVERFLOW" Restzeichenausgabe  +
+                  rechtsbündig, hierbei werden " ;)," und +
+                  als Trennzeichen in der angegebenen     +
+                  Priorität benutzt.                      +
+                                                          +
++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```



```
8010 REM ***************** KMARK ************************
8020 REM
8030 REM
8040 REM MARKIERT DIE EINZELNEN KURVEN


8050 REM ***********************************************
8060 DIM A(2,250), C(10), I(16), E(3,250)
8070 DCL B0(8,U8), 32(X8,X18,Y8,Y18)
8080 FILES
     +PLOAT4;+PLOAT3;+PLOAT2;+PLOAT1;+RETURN;+PLOAT;
8085 SCRATCH :3
8090 LET A0=0


8100 REM ***      #730
8110 READ :1,X,U8,X0,Y0,X1,X2,T1,Y1,Y2,T2 EOF 5000
8120 READ
     1,B,M,A1,A2,D1,D2,A3,B2,M2,B2,M2,X0,X9,M1,Y0,Y9,M2,X3,
                                                        X6
8130 LET G=0
8140 LET A0=A0+1
8150 LET L0=INT(X)
8155 DISP "BILD",A0


8160 REM *** FN READ WERTEPAARE ***
8170 DEF FNA I,J
8180 READ :1,U8,M,X18,Y18,T0
```

```
**** ENDE PROGRAMM PLOT0  ******
```

```
0190 FOR I=1 TO M STEP 1
0200 READ  1,A(1,I),A(2,I)
0210 NEXT I
0211 ON T0 GOTO 212,220
0212 FOR I=1 TO 26 STEP 1      0211
0213 READ  1,J
0214 NEXT I
0220 READ  1,2$,F,F9      0211
0230 LET FN=1
0240 FNEND


0250 REM *** FNEND ***


0500 REM *** KURVEN VOM +PLDATA LESEN ***
0510 LET G=G+FNR      0550 0570 0590 0596
0520 LET E(1,G)=G
0530 ON INT(F)+1 GOTO 540,540,560,580,595
0540 LET G=G-1      0530 0530
0550 ON F9 GOTO 600,510
0560 GOSUB 1000      0530
0570 ON F9 GOTO 600,510
0580 GOSUB 2000      0530
0590 ON F9 GOTO 600,510
0595 GOSUB 2500      0530
0596 ON F9 GOTO 600,510


0600 REM *** Markierungsparameter berechnen und nach
             +PLDAT1 schreiben ***      0550 0570 0590 0596
0610 LET Z=2
0620 GOSUB 4000
0630 GOSUB 4200
0640 LET Z=1
0650 GOSUB 4000
0680 FOR J=1 TO G STEP 1
0690 FOR I=2 TO 3 STEP 1
0700 WRITE  3,E(I,J)
0710 NEXT I
0720 NEXT J
0730 GOTO 100


1000 REM *** READ +PLDAT2 (E-FUNKT.) ***      0560
1010 READ  4,A,K,S0,S1,S2,M
1020 LET Y=A*EXP(K*X2)
1030 REM PRUEFG.?
1040 LET E(2,G)=E(3,G)=Y
1050 RETURN
```



```
2000 REM *** READ +PLDAT3 (POLYNOM) ***      0580
2010 READ :S,S,M
2020 FOR I=1 TO M STEP 1
2030 READ :S,C(I)
2040 NEXT I
2050 LET Y=0
2060 FOR J=1 TO M STEP 1
2070 LET Y=Y+C(J)*X2↑(J-1)
2080 NEXT J
2090 REM PRUEFG.?
2100 LET E(2,G)=E(3,G)=Y
2110 RETURN


2500 REM *** READ +PLDAT4 (DOPP.E-FUNKT.) ***      0595
2510 READ
        :6,I,I,I,I,I,I,I,I,I,I,I,U1,I,I,I,U2,I,I,I,U3,I,I,I,U4,I,
                                                                  I,I
2511 IF U1<9E99 THEN 2520
2512 LET Y=U1
2513 GOTO 2540
2520 LET Y=U1+EXP(-U2*X2)+U3*EXP(-U4*X2)      02511
2530 REM PRUEFG.?
2540 LET E(2,G)=E(3,G)=Y      03513
2550 RETURN


4000 REM *** SUB MAT E nach E(2,*) steigend sortieren ***
                                                  0520 0600
4010 FOR J=1 TO G-1 STEP 1
4020 FOR I=1 TO G-1 STEP 1
4030 IF J+I>G THEN 4110
4040 IF E(2,J+1)>=E(2,J) THEN 4100
4050 FOR I1=1 TO 3 STEP 1
4060 LET I2=E(I1,J+1)
4070 LET E(I1,J+1)=E(I1,J)
4080 LET E(I1,J)=I2
4090 NEXT I1
4100 NEXT I      04040
4110 NEXT J      04030
4120 RETURN


4200 REM *** SUB Markierungspunkte n.Bedarf spreizen und
                                                  [illegible]
4210 LET J=0
4220 LET J=J+1      04340
4230 IF J>1000 THEN 4350
4240 DISP "BILD";A0;TAB(16);"Iteration";J
4250 LET K=0
4260 FOR I=1 TO G-1 STEP 1
4270 IF (E(3,I)<Y0) OR (E(3,I)>Y9) THEN 4330
```



```
4280 LET D=E(3,I+1)-E(3,I)
4290 IF D>=M2*M2*.99 THEN 4330
4300 LET K=1
4310 LET E(3,I)=E(3,I)-(M2*M2-D)/2
4320 LET E(3,I+1)=E(3,I+1)+(M2*M2-D)/2
4330 NEXT I      04270 04290
4340 ON K GOTO 4220
4350 LET E0=E(3,1)-M2*M2/2+1.1      04230
4360 LET E9=E(3,G)+M2*M2/2+1.1
4370 LET D=E9-E0-Y9+Y0
4380 IF D>0 THEN 4470
4390 IF E0>Y0 THEN 4410
4400 GOTO 4430
4410 IF E9<Y9 THEN 4520      04390
4420 GOTO 4450
4430 LET D=Y0-E0      04400
4440 GOTO 4490
4450 LET D=Y9-E9      04420
4460 GOTO 4490
4470 LET D=Y0-D/2      04380
4480 LET D=D-E(3,1)
4490 FOR I=1 TO G STEP 1      04440 04460
4500 LET E(3,I)=E(3,I)+D
4510 NEXT I
4520 RETURN .   04410


5000 REM *** STEUERUNG ***      0110
5010 READ :2,U$ EOF 5250
5020 SCRATCH :7
5030 LET M1=M2=0
5040 READ :2,I$ EOF 5130      03000
5050 WRITE  7,I$
5060 LET M2=M2+1
5070 IF I$="0" THEN 5090
5080 GOTO 5040
5090 READ :2,I EOF 5130      05070 05120
5100 WRITE :7,I
5110 LET M1=M1+1
5120 GOTO 5090
5130 RESTORE :7      05040 05090
5140 SCRATCH :2
5150 FOR J=1 TO M2 STEP 1
5160 READ :7,I$
5170 WRITE :2,I$
5180 NEXT J
5190 FOR J=1 TO M1 STEP 1
5200 READ :7,I
5210 WRITE :2,I
5220 NEXT J
5230 DISP U$
5240 CHAIN U$
```



```
5250 END      05010


ENDE PROGRAMM KMARK   ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES     0,... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,      *
*  LISTEN-          stehe am Sprungziel.                        *
*  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Rasterzeichenausgabe    *
*                   rechtsbuendig, hierbei werden " ;)," als    *
*                   Trennzeichen in der angegebenen Prioritaet  *
*                   benutzt.                                    *
*                                                               *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  X Y P L O T                    Ausdruck vom 24.11.85
--------  ===========                    ---------------------
                                                   Seite  - 1 -


0010 REM ***************** XYPLOT ************************
0020 REM
0030 REM
0040 REM DIAGRAMM MIT LINEAREN OD. LOGAR. ACHSEN


0050 REM ***********************************************
0060 DIM A(2,150), C(10), I(32)
0070 DCL 90 (18,U8)
0080 FILES
     +PLDATA,+RETURN;+PLDAT0;+PLDAT1;+PLDAT2;+PLDAT3;
                                          +PLDAT4,+FLKMF
0090 LET A0=0


0100 REM ***        0725 0740
0110 READ :1,X,I0,I0,I0,X1,X2,T1,Y1,Y2,T2 EOF 6000
0120 READ
     1,B,M,A1,A2,O1,O2,A3,B2,H2,B3,H3,X0,X9,M1,Y0,Y9,M2,X3,
                                                        A6
0130 LET G=0
0140 LET A0=A0+1
0141 DISP "BILD",A0
0145 LET L1=INT(X/10)+1
0150 ON L1 GOTO 152,151
0151 LET X=X-10      0150
0152 LET L0=INT(X)     0150
0155 LET T0$="WIE TA0.1"
```

```
PROGRAMM XYPLOT    24.11.85                          Seite  -

0160 REM *** FN READ WERTEPAARE ***
0170 DEF FNR I,J
0180 READ :1,I$,M,I$,I$,T0
0190 FOR I=1 TO M STEP 1
0200 READ :1,A(1,I),A(2,I)
0210 NEXT I
0211 ON T0 GOTO 212,220
0212 FOR I=1 TO 26 STEP 1      0211
0213 READ :1,J
0214 NEXT I
0220 READ :1,Z$,F,F9      0211
0230 LET FN=1
0240 FNEND


0250 REM *** FNEND ***


0500 REM *** UEBERSCHRIFT ******
0505 ON L1 GOTO 510,640
0510 READ  3,X      0505
0520 FOR I=1 TO X STEP 1
0530 READ :3,I$
0540 PRINT I$
0550 NEXT I


0640 REM *** GOSUB  KOORD.KREUZ      0505
0650 LET I=FNR
0655 ON L1 GOTO 660,670
0660 GOSUB 2000      0655


0670 REM *** GOSUB  WERTE ZEICHNEN      0655 0710
0680 GOSUB 4000


0690 REM *** FORTSETZUNG ***
0710 ON INT(F9) GOTO 720,670


0720 REM *** BILDAUSGABE ***      0710
0725 ON L1 GOTO 730,100
0730 DISP      0725
0731 DRAW 8-8
0740 GOTO 100


2000 REM *** SUB KOORD.KREUZ   ******      0660
2005 DISP "BILD",A0,"KOORD.-KREUZ"
2010 IMIMAGE +BILD.2
```

```
PROGRAMM XYPLOT    24.11.85                          Seite  - 3 -

2020 FRAME 0,M
2030 SCALE X0,X9,Y0,Y9
2034 LET I=T1
2035 ON L0 GOTO 2036,2040,2051
2036 LET I=I/5      0 2035
2040 XAXIS Y1,I,X1,X2      0 2035 0 2057
2041 GOTO 2060
2051 CSIZE B2,H2,PI/2      0 2035
2052 MOVE X6+.3*H2*M1,Y0
2053 CPLOT "CONTROL-X"
2057 GOTO 2040
2060 YAXIS X3,T2/3,Y1,Y2      0 2041
2100 MOVE B1,M1,B9,M9
2110 CSIZE B1,M1,0
2120 FOR I=Y1 TO Y2 STEP T2
2130 READ  3,I1,J1,I$
2131 MOVE I1,J1
2160 CPLOT I$
2170 NEXT I


2180 REM *** MARK. XAXIS ****


2610 REM *** CPLOT MARK.
2620 READ :3,I1,J1      0 2690
2630 IF I1=9E99 THEN 2760
2640 READ :3,I2,J2,I3,J3,I$
2650 MOVE I1,J1
2660 PLOT I2,J2
2670 MOVE I3,J3
2680 CPLOT I$
2690 GOTO 2620


2760 REM *** CPLOT END      0 2630
2770 CSIZE B9,M9,0
2780 READ :3,I1,J1      0 2830
2790 IF I1=9E99 THEN 2930
2800 READ :3,I$
2810 MOVE I1,J1
2820 CPLOT I$,X
2830 GOTO 2780


2880 REM *** ZUSATZ LOG.ACHSE      0 2790
2890 ON L0 GOTO 3100,2950,2950
2930 READ  3,I1,J1      0 2940 0 2940 0 3020
2940 IF I1=9E99 THEN 3100
2950 READ :3,I2,J2,I3,J3,I$
2960 MOVE I1,J1
2980 PLOT I2,J2
```

```
PROGRAMM XYPLOT    24.11.85                          Seite  - 4 -

3000 MOVE I3,J3
3010 CPLOT I$
3020 GOTO 2950


3100 REM *** TEXT ACHSEN ***      0 2940 0 2960
3200 READ :3,B1,M1
3210 CSIZE B1,M1,0
3220 READ :3,I1,J1,I$
3225 FOR J=0 TO M2/70 STEP M2/70
3226 FOR I=0 TO M1/70 STEP M1/70
3230 MOVE I1+I,J1+J
3231 CPLOT I$
3235 NEXT I
3236 NEXT J
3260 CSIZE B1,M1,PI/2
3270 READ :3,I1,J1,I$
3275 FOR J=0 TO M2/70 STEP M2/70
3276 FOR I=0 TO M1/70 STEP M1/70
3280 MOVE I1+I,J1-J
3290 CPLOT I$,X
3291 NEXT I
3292 NEXT J
3300 RETURN


4000 REM *** SUB WERTE ZEICHNEN ***      0680
4010 ON SGN(G) GOTO 4040
4020 LET G=G+1
4030 GOTO 4045
4040 LET G=G+FNR      0 4010
4045 ON L1 GOTO 4050,5550      0 4030
4050 DISP "BILD",A0;TA0(16);"KURVE";G      0 4045
4060 CSIZE B2,H2,0
4080 FOR I=1 TO M STEP 1
4081 LET Y=A(2,I)
4082 IF (Y<Y1) OR (Y>Y2) THEN 4170
4090 LET X=A(1,I)
4100 ON L0 GOTO 4120,4104,4101
4101 IF X>0 THEN 4110      0 4100
4102 LET X=X6
4103 GOTO 4130
4104 IF X>0 THEN 4110      0 4100
4105 GOTO 4170
4110 LET X=LGT(X)      0 4101 0 4104
4130 IF (X<X1) OR (X>X2) THEN 4170      0 4100
4150 IF Z$<>"B" THEN 4165      0 4103
4151 LET S=F*10*M1
4152 MOVE X-S,Y1
4153 PLOT X-S,Y
4154 PLOT X+S,Y
4155 BUILD I0,G
```

```
4156 MOVE X+5-B2+M1,Y-M2+M2
4157 CPLOT REP$(I0," ","",-1,1)
4158 MOVE X+5,Y
4159 PLOT X+5,Y1
4160 GOTO 4170
4163 MOVE X-.3+B2+M1,Y-.3+M2+M2     04158
4166 CPLOT Z0
4170 NEXT I     04082 04103 04130 04160


4180 REM ooo ? AUF ACHSEN ooo
4181 LET B1=B2
4182 LET M1=M2
4183 LET W=0
4185 REM wenn kein "?", dann
4186 GOTO 4410
4190 FOR I=1 TO M STEP 1
4191 LET Y=A(2,I)
4192 IF (Y<Y1) OR (Y>Y2) THEN 4200
4200 LET X=A(1,I)
4210 ON L0 GOTO 4240,4214,4211
4211 IF X>0 THEN 4220     04210
4212 LET X=X6
4213 GOTO 4260
4214 IF X>0 THEN 4220     04210
4215 GOTO 4200
4220 LET X=LCT(X)     04211 04214
4240 IF (X<X1) OR (X>X2) THEN 4200     04210
4260 MOVE X-.3+B1+M1,Y1     04213
4270 CPLOT "?"
4280 NEXT I     04192 04215 04240
4290 LET W=3*PI/2
4300 CSIZE B1,M1,W
4310 FOR I=1 TO M STEP 1
4311 LET Y=A(2,I)
4312 IF (Y<Y1) OR (Y>Y2) THEN 4400
4320 LET X=A(1,I)
4330 ON L0 GOTO 4360,4334,4331
4331 IF X>0 THEN 4340     04330
4332 LET X=X6
4333 GOTO 4380
4334 IF X>0 THEN 4340     04330
4335 GOTO 4400
4340 LET X=LCT(X)     04331 04334
4360 IF (X<X1) OR (X>X2) THEN 4400     04330
4380 MOVE X3,Y+.3+M1+M2     04333
4390 CPLOT "?"
4400 NEXT I     04312 04335 04360
4410 REM Kurven einzeichnen ? >>>>     04106
4415 ON INT(F) GOTO 4430,4670,4740,4920
4420 RETURN
```



```
4430 REM ooo GERADEN     04415
4435 LET I=1
4440 FOR J=1 TO M STEP 1
4441 LET Y=A(2,J)
4442 IF (Y<Y1) OR (Y>Y2) THEN 4530
4450 LET X=A(1,J)
4460 ON L0 GOTO 4490,4464,4461
4461 IF X>0 THEN 4470     04460
4462 LET X=X6
4463 GOTO 4510
4464 IF X>0 THEN 4470     04460
4465 GOTO 4530
4470 LET X=LCT(X)     04461 04464
4490 IF (X<X1) OR (X>X2) THEN 4530     04460
4510 ON I GOTO 4511,4514     04463
4511 MOVE X,Y     04510
4512 LET I=2
4513 GOTO 4531
4514 PLOT X,Y     04510
4520 GOTO 4531
4530 LET I=1     04442 04465 04490
4531 NEXT J     04513 04520
4660 RETURN


4670 REM ooo PLOT E-FUNKTION ooo     04415
4680 READ :S,A,K,S0,S1,S2,M
4690 MOVE X1,A*EXP(K*X1)
4700 FOR I=X1 TO X2 STEP (X2-X1)/100
4710 PLOT I,A*EXP(K*I)
4720 NEXT I
4730 GOTO 5920


4740 REM ooo PLOT POLYNOM ooo     04415
4750 READ :6,S,M
4760 FOR I=1 TO M STEP 3
4770 READ :6,C(I)
4780 NEXT I
4790 DEF FNY(X)I,F
4791 ON L0 GOTO 4800,4792
4792 LET X=10↑X     04791
4800 LET F=0     04791
4810 FOR I=1 TO N STEP 1
4820 LET F=F+C(I)*X↑(I-1)
4830 NEXT I
4840 LET FN=F
4850 FNEND
4860 LET J=1
4870 FOR I=X1 TO X2 STEP (X2-X1)/100
4880 LET Y=FNY(I)
```



```
4890 IF (Y<Y1) OR (Y>Y2) THEN 4911
4891 ON J GOTO 4892,4900
4892 MOVE I,Y     04891
4893 LET J=2
4900 PLOT I,Y     04891
4910 GOTO 4912
4911 LET J=1     04890
4912 NEXT I     04910
4915 GOTO 5920


4920 REM ooo PLOT SUM 2 E FUNKTIONEN ooo     04415
4925 DEF FNE(X)=U(1)*EXP(-U(2)*X)+U(3)*EXP(-U(4)*X)
4930 READ :7,I,I,I,I,I,I,I,I,M
4931 FOR I=1 TO M STEP 1
4932 READ :7,U(I),D(I),W(I),K(I)
4933 NEXT I
4935 IF U(1)<>9E99 THEN 4940
4936 PRINT "KURVE";C;": Keine Berechnung d. dopp.
                                        e-Funktion!"
4937 GOTO 5920
4940 MOVE X1,FNE(X1)     04935
4950 FOR I=X1 TO X2 STEP B1/70
4960 PLOT I,FNE(I)
4970 NEXT I
4980 GOTO 5920


5920 REM ooo Kurvenbarriere. ooo     04730 04913 04937
                                                    04980
5921 CSIZE B3,H3,0
5925 READ :4,I,J
5926 IF I=9E99 THEN 5990
5930 MOVE X2+2/70*M1,I
5935 PLOT X9-M1*(B3+B2+2/70),J
5940 MOVE X9-M1*(B3+B2),J-M2*H3*.3
5945 CPLOT Z0
5950 BUILD Z0,F     04045
5952 LET Z0=REP$(Z0," ","",-1,1)
5954 CSIZE B2,H2,0
5956 CPLOT Z0,%
5990 RETURN     03926


6000 REM ooo STEUERUNG ooo     0110
6010 READ :2,U0 EOF 6130
6020 SCRATCH :0
6030 LET M1=M2=0
6040 READ :2,I0 EOF 6130     06000
6050 WRITE :0,I0
6060 LET M2=M2+1
6070 IF I0="0" THEN 6080
```



```
6080 GOTO 6040
6090 READ :2,I EOF 6130     06070 06120
6100 WRITE :0,I
6110 LET M1=M1+1
6120 GOTO 6090
6130 RESTORE :0     06040 06090
6140 SCRATCH :2
6150 FOR J=1 TO M2 STEP 1
6160 READ :0,I0
6170 WRITE :2,I0
6180 NEXT J
6190 FOR J=1 TO M1 STEP 1
6200 READ :0,I
6210 WRITE :2,I
6220 NEXT J
6230 DISP U0
6240 CHAIN U0
6250 END     06010


ENDE PROGRAMM XYPLOT   ooooo
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES      0.... = Zeilennr. als Sprungzielangabe,    *
*  LISTEN:           steht am Sprungziel.                        *
*  ------------      Bei "LINE OVERFLOW" Zeilenschaltung         *
*                    rechtsbündig; hierbei werden " ],"          *
*                    als Trennzeichen in der angegebenen         *
*                    Priorität benutzt.                          *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  P L T A B                          Ausdruck vom 24.11.85
--------  =========                          ---------------------
                                                        Seite  - 1 -


0010 REM ***************** PLTAB ************************
0020 REM                   -----
0030 REM LIEFERT LEGENDEN (& TABELLEN) ZU DEM BILDERN


0040 REM ********************************************
0050 FILES
     +PLDATA:+RETURN,+PLDAT1:+PLDAT2:+PLDAT3:+PLDAT4:+FLKHF
0060 DIM A(2,250), A$(2), C(10)
0070 DCL 80(15,105,U8), 32(X8,Y8,A$()
0080 LET G1=CHR$(34)
0090 REM S9 = SIGNIF.STELLEN FUER PARAM-AUSDR.
0100 LET S9=4
0110 LET A0=0
0120 RESTORE -1


0200 REM ***      0650 01520
0210 READ :1,X,U8,X8,Y8,X1,X2,T1,Y1,Y2,T2 EOF 3000
0220 READ
     :1,B,M,A1,A2,D1,D2,A3,B2,M2,B3,M3,X0,X9,M1,Y0,Y9,M2,X3,
                                                            X6
0230 LET G=0
0240 LET A0=A0+1
0250 LET F0=INT(10*(X-INT(X)))
0260 LET L0=INT(X)
0270 ON L0 GOTO 300,200,200
0280 LET X1=FNS(10*X1,9)      0270 0270
0290 LET X2=FNS(10*X2,9)
```

```
PROGRAMM PLTAB    24.11.85                          Seite  - 2 -


0300 REM *** FN READ VERTEPARAME ***
0310 DEF FNR I,J
0320 READ :1,U8,M,A$(1),A$(2),T0
0330 FOR I=1 TO M STEP 1
0340 READ :1,A(1,I),A(2,I)
0350 NEXT I
0351 ON T0 GOTO 352,360
0352 FOR I=1 TO 26 STEP 1     0351
0353 READ :1,J
0354 NEXT I
0360 READ :1,Z0,F      0351
0370 LET FN=1
0380 FNEND


0390 REM *** ***


0400 REM *** AUSDRUCK? ***      0270
0510 ON F0 GOTO 1000,1000,520
0520 LET I=FNR      0510 0650
0530 REM READ +PLDATn !!!
0540 ON F-1 GOTO 560,300,630
0550 GOTO 640
0560 READ :4,A,K,S0,S1,S2,I0      0540
0570 GOTO 640
0580 READ :5,S,M      0540
0590 FOR I=1 TO M STEP 1
0600 READ :3,C(I)
0610 NEXT I
0620 GOTO 640
0630 READ :6,I,I,I,I,I,I,I,I,I,I,M      0640
0631 FOR J=1 TO 4*M STEP 1
0632 READ :6,I
0633 NEXT J
0640 READ :1,F      0550 0570 0620
0650 ON F GOTO 280,520


1000 REM *** UEBERSCHRIFT      0510 0510
1010 PRINT
1020 PRINT
1030 PRINT "Legende ";
1040 ON F0 GOTO 1050,1060
1050 PRINT "& Wertetabellen ";      01040
1060 PRINT "zu Abbildung",A0      01040
1070 LET I0=""
1080 PAD I0,35
1090 PRINT I0
1100 PRINT
```

```
PROGRAMM PLTAB    24.11.85                          Seite  - 3 -


1110 PRINT
1120 PRINT U8
1130 FOR I=1 TO LEN(U8) STEP 1
1140 PRINT "";
1150 NEXT I
1160 PRINT
1170 PRINT
1180 PRINT


1190 REM ***


1200 REM *** GOSUB TABELLE *****      01520
1210 GOSUB 4000


1500 REM *** FORTSETZUNG ***
1510 READ :1,F
1520 ON F GOTO 200,1200


2000 REM *** SUB AUSDRUCK TABELLE   *****      04090 04200
2010 PRINT
2020 PRINT
2030 PRINT "Kurve";G;":";TAB(81-LEN(U8));U8
2040 LET I0=""
2050 PAD I0,126
2060 PRINT I0
2070 PRINT "Die";M,"Messwerte wurden durch ";
2080 IF Z0<>"0" THEN 2110
2090 PRINT "Saeulen dargestellt"
2100 GOTO 2500
2110 PRINT C0+Z0+C0+" gekennzeichnet";      02000
2120 ON INT(F) GOTO 2130,2170,2230,2300
2130 PRINT ","
2140 GOTO 2500
2150 PRINT " und durch Geraden verbunden,"      02120
2160 GOTO 2500
2170 READ :4,A,K,S0,S1,S2,I0      02120
2173 IF A>=E90 THEN 2400
2180 PRINT " und an die E-Funktion "
2190 PRINT "Y=A*EXP(K*X) angepasst,","(";I0;"Iterationen )"
2200 PRINT "Parameter:","A =",FNS(A,S9);TAB(37);"K
                                                  =";FNS(K,S9)
2210 PRINT "Standardabw.","Sa =";FNS(S1,S9);TAB(37);"S
                                                  =";FNS(S2,S9);
2220 PRINT TAB(37);"Sy =";FNS(S0,S9)
2230 PRINT "Halbwerts:","X(1/2) =
                          -LOG(2)/K:";FNS(-LOG(2)/K,S9);A0(1)
2240 GOTO 2500
2250 PRINT " und an ein Polynom der Form ";      02120
```

```
PROGRAMM PLTAB    24.11.85                          Seite  - 4 -


2260 PRINT "F(X) = A(0) + A(1)*X + A(2)*X*2 + ... +
                                          A(n)*X*n angepasst,"
2270 READ :5,S,M
2280 PRINT "Parameter:";
2290 FOR I=1 TO M STEP 1
2300 READ :3,C(I)
2310 LET I1=I-1
2320 BUILD I0,I1
2330 LET I1=12+23*(I1-3*INT(I1/3))
2340 PRINT TAB(I1);"A("+REP$(I0," ","",-1,1)+")
                                                  =";FNS(C(I),S9);
2350 NEXT I
2360 PRINT TAB(1);"Summe der Abweichungsquadrate";FNS(S,S9)
2370 GOTO 2500
2380 READ :6,Z0,M0,M7,M6,M5,P9,E9,S0,I,M      02120
2381 FOR I=1 TO M STEP 1
2382 READ :6,U(I),O(I),V(I),K(I)
2383 NEXT I
2390 IF U(1)<9E99 THEN 2420
2400 PRINT ", die gewuenschte Anpassung","konnte nicht
                                   ausgefuehrt werden!"      02175
2410 GOTO 2500
2420 PRINT " und an die doppelte E-Funktion"      02390
2430 PRINT "Y=A*EXP(-a*X)+B*EXP(-b*X) angepasst,"
2435 BUILD
     I0,"(",Z0,"Iter.,",M0,"Lattice-Search,",M7,"Nebenmin.,"
2436 BUILD I0,I0," Converg.=",FNS(P9,S9),")"
2438 PRINT TAB(81-LEN(I0));I0
2439 PRINT
2440 PRINT "Parameter:","A =";FNS(U(1),S9);TAB(37);"B
                                                  =";FNS(U(3),S9)
2450 PRINT ,"a =";FNS(U(2),S9);TAB(37);"b =";FNS(U(4),S9)
2460 PRINT "Standardabw.:","SA =";FNS(O(1),S9);TAB(37);"SB
                                                  =";FNS(O(3),S9);
2461 PRINT TAB(37);"Sum of Squares:"
2470 PRINT ,"Sa =";FNS(O(2),S9);TAB(37);"Sb =";FNS(O(4),S9);
2471 PRINT TAB(37);FNS(S0,S9)
2480 PRINT "Halbwerts:","X(1/2)a =
                        LOG(2)/a";TAB(37);"X(1/2)b = LOG(2)/b"
2490 PRINT "
     (";A$(1)+")",FNS(LOG(2)/U(2),S9);TAB(37);
                                        FNS(LOG(2)/U(4),S9)
2500 PRINT       02100 02140 02160 02240 02370 02410
2510 ON F0 GOTO 2520,3070      04090 04200
2520 PRINT
     FNZ8(M2-M1,3,"-","","T","--------------------T",-------|")
                                                          02510
2530 BUILD USING 2540,I0,"Probe Nr."
2540 ::LLLLLLLLLLLLLLLL
2550 FOR I=M1 TO M2 STEP 1
2560 LET X8=Y8-2
2570 BUILD USING 2580,I10,I
```

```
2580  *****!
2590 IF (A(1,I)=0) AND (L0=3) THEN 2620
2600 IF (A(1,I)>X1) AND (A(1,I)<=X2) THEN 2620
2610 LET X2=X0+1
2620 IF (A(2,I)>Y1) AND (A(2,I)<=Y2) THEN 2640      0 2590
                                                      0 2600
2630 LET Y2=Y0+1
2640 IF X0+Y0=4 THEN 2670      0 2620
2650 LET E0=LEN(I1$)-INT(LGT(I1$))-2
2660 LET I1$=REP$(I1$," ","*",1,E0)
2670 LET I$=I$+I1$      0 2640
2680 NEXT I
2690 PRINT I$
2700 LET
        I0$=FM2$(M2-M1+1,5,"-","","|","----------------|","")
2710 PRINT I0$
2720 FOR J=4 TO 2 STEP 1
2730 BUILD USING 2540,I$,A$(J)
2740 FOR I=M1 TO M2 STEP 1
2750 LET X=A(J,I)
2760 IF J>1 THEN 2780
2770 IF (X)0) AND (X<.1) THEN 2950
2780 IF X>=1E4 THEN 2950      0 2760
2790 IF ABS(X)>=1 THEN 2870
2800 IF X<0 THEN 2830
2810 LET I1$="      0!"
2820 GOTO 3000
2830 BUILD USING 2840,I1$,X      0 2800
2840   ##.###
2850 LET I1$=REP$(I1$,"0","",1,1)+"!"
2860 GOTO 3000
2870 LET I1=5*10↑(INT(LGT(ABS(X)))-3)*SGN(X)      0 2790
2880 LET I1=4-INT(LGT(ABS(X+I1)))
2890 IF I1>0 THEN 2910
2900 LET I1=1
2910 LET I2=I1+4      0 2890
2920 LET I2$=EXT$("#####.##",I1,I2)+"!"
2930 BUILD USING 120,I1$,X
2940 GOTO 3000
2950 BUILD USING 2960,I1$,X      0 2770 0 2780
2960   ##.##↑↑↑
2970 LET I1$=REP$(I1$," ","",1,1)
2980 LET I1$=REP$(I1$,"E-0","-",1,1)
2990 LET I1$=REP$(I1$,"E+0","+",1,1)+"!"
3000 LET I$=I$+I1$      0 2820 0 2860 0 2940
3010 NEXT I
3020 PRINT I$
3030 IF J<2 THEN 3050
3040 LET
     I0$=FM2$(M2-M1+1,5,"_","","|","----------------|",
                                                        "-----|")
3050 PRINT I0$      0 3030
```



```
3060 NEXT J
3070 RETURN      0 2510

4000 REM ***  SUBROUTINE FUER  *****      0 4210
4010 REM      AUFRUF DER TABELLEN-SUBROUTINE IN
                                                ZEHNERGRUPPEN
4020 LET E0=Z=0
4030 LET X7=Y7=2
4040 LET G=G+FNR
4050 LET M1=Z*10+1      0 4220
4060 LET M2=Z*10+10
4070 IF M2<M THEN 4200
4080 LET M2=M
4090 ON SGN(Z)+1 GOSUB 2000,2510
4100 IF E0=0 THEN 4190
4110 PRINT "Bei mit '*' versehenen Proben-Nr. liegt der ";
4120 ON X7 GOTO 4130,4140
4130 PRINT G$+A$(1)+C$+"-Vert ";      0 4120
4140 IF X7+Y7>2 THEN 4160      0 4120
4150 PRINT "bzw. der ";
4160 ON Y7 GOTO 4170,4180      0 4140
4170 PRINT G$+A$(2)+C$+"-Vert ";      0 4150
4180 PRINT "ausserhalb des Skalenbereichs"      0 4150
4190 RETURN      0 4100
4200 ON SGN(Z)+1 GOSUB 2000,2510      0 4070
4210 LET Z=Z+1
4220 GOTO 4050

4300 REM *** FMZ$ ***
4310 DEF FMZ$(N,M,I$,I1$,I2$,I3$,I4$)I,F$,F1$
4320 DCL $$ (FM=0,F1$)
4330 LET F$=""
4340 FOR I=1 TO M STEP 1
4350 LET F$=F$+I$
4360 NEXT I
4370 LET F$=I1$+F$+I2$
4380 LET F1$=""
4390 FOR I=1 TO M STEP 1
4400 LET F1$=F1$+F$
4410 NEXT I
4420 LET FM$=J1$+F1$+J2$
4430 FNEND


4440 REM ******


5000 REM *** STEUERUNG ***      0 210
5010 READ :2,U$ EOF 9000
5020 SCRATCH :7
```



```
5030 LET M1=M2=0
5040 READ :2,I$ EOF 5130      0 5000
5050 WRITE :7,I$
5060 LET M2=M2+1
5070 IF I$="#" THEN 5090
5080 GOTO 5040
5090 READ :2,I EOF 5130      0 5070 0 5120
5100 WRITE :7,I
5110 LET M1=M1+1
5120 GOTO 5090
5130 RESTORE :7      0 5040 0 5090
5140 SCRATCH :2
5150 FOR J=1 TO M2 STEP 1
5160 READ :7,I$
5170 WRITE :2,I$
5180 NEXT J
5190 FOR J=1 TO M1 STEP 1
5200 READ :7,I
5210 WRITE :2,I
5220 NEXT J
5230 DISP U$
5240 CHAIN U$
5250 GOTO 9000


6000 REM *** FMS RUNDET AUF M SIGNIF. STELLEN ***
6010 DEF FMS(X,M)E,$
6020 LET M=INT(M)-1
6030 LET S=SGN(X)
6040 LET X=ABS(X)
6050 IF (X=0) OR (M<0) THEN 6110
6060 LET E=LGT(X)
6070 LET E=SGN(E)*INT(ABS(E))+SGN(SGN(E)+1)-1
6080 LET X=X*10↑(M-E)
6090 LET X=INT(X+.5)
6100 LET X=X*10↑(E-M)
6110 LET FM=S*X      0 6030
6120 FNEND
9000 END      0 5010 0 5250


ENDE PROGRAMM PLTAB  ******
```

```
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
+                                                           +
+  FORMATIERTES    8.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,   *
+  LISTEN:         steht am Sprungziel.                     *
+  ------------    Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe   *
*                  rechtsbündig; hierbei werden " ;)."      *
*                  als Trennzeichen in der angegebenen      +
+                  Priorität benutzt.                       +
*                                                           *
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```

```
PROGRAMM  P R I O I S                    Ausdruck vom 24.11.85
--------  ===========                    ---------------------
                                                   Seite - 1 -


0010 FILES +RETURN
0020 DCL $$ (I$,I1$)
0030 LET L=P=M=P0=M0=M=0
0040 LET I$="READY"
0050 READ :1,I1$ EOF 120      0 110
0060 IF I1$="$" THEN 120
0070 IF M=0 THEN 90
0080 PRINT I$
0090 LET M=1      0 70
0100 LET I$=I1$
0110 GOTO 50
0120 DISP I$      0 50 0 60
0130 READ :1,L,P,M,P0,M0 EOF 140
0140 FOR K=1 TO M0 STEP 1      0 130
0150 FOR J=1 TO M STEP 1
0160 DISP
0170 FOR I=1 TO L STEP 1
0180 BEEP
0190 DELAY 1
0200 NEXT I
0210 DISP I$
0220 FOR I=1 TO P STEP 1
0230 DELAY 1
0240 NEXT I
0250 NEXT J
0260 FOR I=1 TO P0 STEP 1
0270 DELAY 1
0280 NEXT I
0290 NEXT K
0300 END


ENDE PROGRAMM PRIOIS  ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,      *
*  LISTEN:          steht am Sprungziel.                        *
*  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe      *
*                   rechtsbuendig, hierbei werden " ;)."        *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen         *
*                   Prioritaet benutzt.                         *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  R E S I D                          Ausdruck von 24.11.85
--------  =========                          ---------------------
                                                        Seite  - 1 -


0010 REM **** RESIDUALS ANGEPASSTE FUNKTION
0015 REM      GEGEN ORIGINALDATENFILE:
0070 REM      GEMESSEN - BERECHNET

0030 LET M=4
0040 LET P=4
0060 LET A2$="BERECHNET"
0070 LET A3$="RESIDUAL"
0080 DIM A(4,250),  P(4),  A$(4)
0090 DCL 80 (10,U8),  7 (F18,F28)
0100 FILES 0:0
0110 FKEY 0:1,1,1:
0120 FKEY 0:2,2,2:
0130 FKEY 0:3,3,3:
0140 REM DEF E-FUNKTION
0150 DEF FNY(X)=P(1)*EXP(-P(2)*X)+P(3)*EXP(-P(4)*X)
0160 BUFFER #32,80


0500 REM **** START ****      0:2000
0510 DISP "ORIGINAL-, RESIDUAL-FILE od.<F1)";
0520 INPUT F18,F28
0525 IF F18<>"1" THEN 530
0526 DISP " CHAIN  FILEPRINT"
0527 CHAIN "FPRINT"
0530 DISP "READ ";F18,"SCRATCH ";F28      0:525
0540 FILE  1,F18
0550 FILE  2,F28
0560 GOSUB 6000
```

```
PROGRAMM RESID    24.11.85                          Seite  - 2 -


1000 REM **** INPUT PARAMETER ****
1010 FOR I=1 TO P STEP 1
1020 DISP "PARAM";I;"= ";
1030 INPUT P(I)
1040 NEXT I
1050 SEND #40,U8      0:1110
1060 CND #40,1
1070 RECEIVE #32,I8
1080 IF I8=U8 THEN 2000
1090 LET U8=I8
1100 PRINT U8
1110 GOTO 1050


2000 REM **** BERECHNUNG UND AUSGABE ****      0:1000
2005 DISP " BERECHNUNG UND AUSGABE"
2010 FOR I=1 TO M STEP 1
2020 LET A(2,I)=A(M,I)
2030 LET J=FNY(A(1,I))
2040 LET A(3,I)=J
2050 LET A(4,I)=A(M,I)-J
2060 NEXT I
2070 GOSUB 4000
2080 GOTO 500


4000 REM **** WRITE RESIDUALS -> F28 ****      0:2070
4010 SCRATCH  2
4012 LET I8="RPNT'S:"
4014 FOR I=1 TO P STEP 1
4016 BUILD I8,I8,P(I)
4018 NEXT I
4020 LET I=LEN(I8)
4022 PRO U#,32
4024 LET U8=EXT$(U8,1,80-I)+I8
4030 WRITE :2,U8,U78,K0,U88,K,U98,M
4035 WRITE :2,A$(1),A$(M),A2$,A3$
4040 FOR J=1 TO M STEP 1
4050 FOR I=1 TO M STEP 1
4060 WRITE :2,A(I,J)
4070 NEXT I
4080 NEXT J
4090 PRINT "RESIDUALS AUS FILE ";F18;" NACH ";F28;", ";I8
4100 RETURN


6000 REM **** SUB READ DATA < F18 ****      0:360
6010 RESTORE :1
6020 READ :1,U8,U78,K0,U88,K,U98,M
6030 FOR I=1 TO M STEP 1
```

```
PROGRAMM RESID    24.11.85                          Seite  - 3 -


6040 READ :1,A$(I)
6050 NEXT I
6060 FOR J=1 TO M STEP 1
6070 FOR I=1 TO M STEP 1
6080 READ  :1,A(I,J)
6090 NEXT I
6100 NEXT J
6110 RETURN
7000 END


EnDE PROGRAMM RESID   ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,      *
*  LISTEN:          steht am Sprungziel.                        *
*  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe      *
*                   rechtsbuendig, hierbei werden " ;)."        *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen         *
*                   Prioritaet benutzt.                         *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  F N V X I                          Ausdruck von 24.11.85
--------  =========                          ---------------------
                                                        Seite  - 1 -


0010 REM BERECHNUNG DER FN-WERTE AM DEM STELLEN X1[1:1,.N]
0020 REM FUER JEWEILS C VERSCHIEDENE BEDINGUNGEN C[1]
                                                   (2,8,001/1)
0030 REM     MIT DEM PARAMETERN P[1,1..P9]
0040 REM UND SCHREIBEN AUF M VERSCHIEDENE FILES F0[1]


0100 REM *** VEREINBARUNGSTEIL
0110 FILES *
0120 RESTORE
0130 READ X0,Y0,X10,P9,C9,M9
0140 REM BEDINGUNG C, Y-DIM, urspr. X-DIM, M [PARAMS],
0143 REM                          Mmax [C], Mmax [FILES]
0150 DATA 001/1,% intakte Eny's,sec,4,20,10
0160 DEF
        FNY(I,X)=P(I,1)*EXP(-P(I,2)*X)+P(I,3)*EXP(-P(I,4)*X)
0170 DIM P(20,4), C(20), F0(10), X(10), U0(10)
0180 DCL 80(10,U0(1)), 7F0()
0190 FKEY 0:1,1E10:
0200 FKEY 0:2,2E10:
0210 FKEY 0:3,0,1E10:
0220 FKEY 0:0,E-


0500 REM **** START ****      0:210


1000 REM *** BEDINGUNGEN UND PARAMETER
1010 FOR C=1 TO C9 STEP 1
1020 BUILD I0,C,") ",X0      0:230
1030 DISP REP$(I0," ","",2,1):TAB(21);"ENDE -> F1 ";
```

```
1040 INPUT C(C)
1050 IF C(C)=1E10 THEN 1270
1060 IF C>1 THEN 1110
1070 PRINT
1080 PRINT
1090 PRINT X$,"PARAMETER 01 BIS",P9,"--->"
1100 PRINT
1110 PRINT C(C),      01060
1120 FOR I=1 TO P9 STEP 1
1130 BUILD I$,C,"]",C(C),X$,": PARAM",I
1140 DISP REP$(I$," ","",2,1);
1150 INPUT P(C,I)
1160 PRINT P(C,I),
1170 NEXT I
1180 LET I=(P9+1)/5
1190 IF (-INT(I)=0 THEN 1210
1200 PRINT
1210 DISP "FEHLER -> F1      WEITER -> F2";      01190 01250
1220 INPUT I
1230 ON I/1E10 GOTO 1020,1260
1240 BEEP
1250 GOTO 1210
1260 NEXT C      01230
1270 LET C=C-1      01050


2000 REM *** FILES UND STELLEN X(
2010 FOR M=1 TO M9 STEP 1
2020 BUILD I$,M,"]","FILE, ",X1$      02140
2030 DISP REP$(I$," ","",2,1),TAB(20),"-> ENDE F3 ";
2040 INPUT F$(M),X(M)
2050 IF X(M)=1E10 THEN 2100
2060 BUILD I$,M,".FILE ",F$(M),":"
2070 PRINT REP$(I$," ","",2,1),
2080 DISP F$(M)," UEBERSCHRIFT:";
2090 RKB I$
2100 BUILD U$(M),I$,X(M),X1$
2110 PRINT U$(M)
2120 DISP "FEHLER -> F1      WEITER -> F2";      02160
2130 INPUT I
2140 ON I/1E10 GOTO 2020,2170
2150 BEEP
2160 GOTO 2120
2170 NEXT M      02140
2180 LET M=M-1      02050


3000 REM *** AUSDRUCK UND WRITE -> FILE F$(X)
3010 FOR I=1 TO M STEP 1
3020 PRINT
3030 PRINT
3040 DISP F$(I),X(I)
```



```
3050 BUILD I$,I,".FILE ",F$(I),":"
3060 PRINT REP$(I$," ","",2,1);"    ",U$(I)
3070 PRINT
3080 FILE : 1,F$(I)
3090 SCRATCH :1
3100 WRITE :1,U$(I),"0",0,"0",0,"M=",C,X$,"","",Y$
3110 FOR J=1 TO C STEP 1
3120 WRITE :1,C(J),0,0,FMY(J,X(I))
3130 PRINT C(J),X$+":";TAB(25);FMY(J,X(I));Y$
3140 NEXT J
3150 NEXT I
3160 PRINT
3170 PRINT
3180 PRINT TAB(35);"**********"
3190 DISP "CHAIN  ODER  F1,  ENDE -> F2";
3200 INPUT I$
3210 IF I$="1E10" THEN 500
3220 IF I$="2E10" THEN 4000
3230 DISP "CHAIN ";I$
3240 CHAIN I$
4000 END      03220


*  ENDE PROGRAMM FMYXI   ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprungbenweisung,     *
*  LISTEN:          steht ab Sprungziel,                        *
*  ------------     0=: 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe      *
*                   rechtsbuendig; hierbei werden " ;," +       *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen         *
*                   Prioritaet benutzt.                         *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  D P R O Z                    Ausdruck vom 24.11.85
--------  =========                    ---------------------
                                                Seite  - 1 -


0010 REM   DIFFERENZ DER MESSWERTE Y( X.B. % (nt.Eryb)
0020 REM   BEI DER KONZENTRATION C: GEGENUEBER DER
                                        KONTROLLE MIT Cnull.
0030 REM
0040 REM   DIE REIHENFOLGE DER C:-WERTE WIRD BEIBEHALTEN.
0050 REM   DIE Cnull-SPALTEN WERDEN ENTFERNT.  DAS
                                        ARITHM.MITTEL
0060 REM   DER YC=-null3 DIENT ALS NEUER
                                        ORDINATEN-NULLPUNKT.
0070 REM   DIE VERSCHIEBUNG DER UEBRIGEN Y( WIRD
0080 REM   UNTER BEIBEHALTUNG DER ORIGINAL-SKT. BERECHNET.


0500 REM *** VEREINBARUNGSTEIL
0510 DATA 0,4,mol/l,% Inhalte Eryb,D[mOGm],0% ggB.Komp.
0520 DIM A(4,130)
0530 DCL B$(U$,I$)
0540 RESTORE
0550 READ K,M
0560 FOR I=1 TO M STEP 1
0570 READ A$(I)
0580 NEXT I
0590 FILES :,*


1000 REM **** START ****      03100
1010 DISP "FILES  ORIGINAL > DELTA-X";
1020 INPUT F10,F20
1030 DISP F10,"SCRATCH ";F20
1040 FILE : 1,F10
1050 FILE : 2,F20
```



```
1070 DISP "STEIGUNG D. REGR.GER.";
1080 INPUT B
1090 PRINT
1100 PRINT
1110 PRINT "FILES ";F1$;" > ";F2$,"STEIGUNG";B
1120 READ :1,U$,I$,I,I$,I$,M
1130 FOR I=1 TO M STEP 1
1140 READ :1,I$
1150 NEXT I
1160 LET A0=M0=0
1170 FOR J=1 TO M STEP 1
1180 FOR I=1 TO M STEP 1
1190 READ :1,A(I,J)
1200 NEXT I
1210 IF A(1,J)<>K THEN 1240
1220 LET A0=A0+A(M,J)
1230 LET M0=M0+1
1240 NEXT J      01210
1250 LET A0=A0/M0
1260 LET M1=0
1270 FOR J=1 TO M STEP 1
1280 IF A(1,J)=K THEN 1340
1290 LET M1=M1+1
1300 LET A(1,M1)=A(1,J)
1310 LET A(2,M1)=A(4,J)
1320 LET A(4,M1)=A(4,J)-A0
1330 LET A(3,M1)=A(4,M1)/B
1340 NEXT J      01280


2000 REM *** UEBERSCHRIFT
2010 BUFFER 032,80      02000
2020 SEND 040,U$
2030 CMD 032,1
2040 RECEIVE 032,I$
2050 IF U$=I$ THEN 3000
2060 PRINT I$
2070 LET U$=I$
2080 GOTO 2010


3000 REM *** WRITE > F2$      02030
3005 SCRATCH :2
3010 WRITE :2,U$,"Y-[CS03]",A0,"StDAG",B,"M=",M1
3020 FOR I=1 TO M STEP 1
3030 WRITE :2,A$(I)
3040 NEXT I
3050 FOR J=1 TO M1 STEP 1
3060 FOR I=1 TO M STEP 1
3070 WRITE :2,A(I,J)
3080 NEXT I
3090 NEXT J
```

```
PROGRA.          24.11.85                    Seite  - 3 -

9100 CH = 1004
9200 ...

****   E PROGRAMM DFNO.   ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES      #.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,     *
*  LISTEN:           steht am Sprungziel.                       *
*  ------------      Bei "LINE OVERFLOW" Restzeichenausgabe     *
*                    rechtsbuendig; hierbei werden " ;," ,      *
*                    als Trennzeichen in der angegebenen        *
*                    Prioritaet benutzt.                        *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  F D I F F                          Ausdruck vom 24.11.85
--------  ==========                         ---------------------
                                                        Seite  - 1 -

0010 REM  DIFFERENZ KORRESPONDIERENDER Y-WERTE CA(M,*)]
0020 REM  AUS 2 DATENFILES (FORMAT NACH PROGR.INPUT).
0030 REM  WRITE:3,(Y1-Y2) WENN X1=X2:  WEGFALL WENN X1<>X2.
0040 LET M=4
0050 DIM A(4,360), F(2), N(2), A$(4), B$(4)
0060 DCL B0 (U1$,U2$),  32 (A$(),B$()),  7 (F1$,F2$,F3$)
0070 FILE$ *;*
0080 FKEY 01,1:
0090 FKEY 02,2:
0100 FKEY 03,3:

0200 REM **** START ****     0210
0210 DISP " FILE01 - FILE02  ->  FILE03  ";
0220 INPUT F1$,F2$,F3$
0230 DISP F1$;" - ";F2$,"-> ";F3$

0300 REM *** DATEN  <- F8 ***
0310 FILE : 1,F1$
0320 FILE : 2,F2$
0330 READ :1,U1$,U7$,K0,U8$,K1,U9$,N(1)
0340 READ :2,U2$,I$,K9,I$,K2,I$,N(2)
0350 LET F1=1
0360 FOR I=1 TO M STEP 1
0370 READ :1,A$(I)
0380 READ :2,B$(I)
0390 IF A$(I)=B$(I) THEN 410
0400 LET F1=2
```

```
PROGRAMM FDIFF    24.11.85                    Seite  - 2 -

0410 NEXT I      0390
0420 ON F1 GOTO 430,440
0430 IF K1=K2 THEN 550      0420
0440 FOR I=1 TO 20 STEP 1     0420
0450 BEEP
0460 DELAY 2
0470 NEXT I
0480 PRINT "PRUEFE OB FILES VERGLEICHBAR:",F1$,F2$
0490 PRINT "K0","K9","K1","K2"
0500 PRINT K0,K9,K1,K2
0510 FOR I=1 TO M STEP 1
0520 PRINT A$(I),"     *****",B$(I)
0530 NEXT I
0540 STOP
0550 LET M=N(1)+N(2)      0430
0560 LET N0=F(1)=F(2)=0
0563 PRINT
0570 PRINT U1$
0580 PRINT U2$
0590 DISP "UEBERSCHRIFT 1 ODER 2; NEU=F3 ";     0620
0600 INPUT I
0610 ON I GOTO 670,630,630
0620 GOTO 590
0630 LET U1$=U2$     0610
0640 GOTO 670
0650 DISP "UEBERSCHRIFT NEU:";     0610 0700
0660 RK0 U1$
0670 PRINT "UEBERSCHRIFT NEU:",U1$     0610 0640
0680 DISP "EINVERSTANDEN?   (JA) (NEIN) ";     0710
0690 INPUT I
0700 ON I GOTO 900,630
0710 GOTO 680

0800 REM *** BEGINN VERGLEICH     0700
0810 DISP A$(1)+":  (↓) oder (↑)  SORTIERT";     0830
0820 INPUT F0
0825 LET F2=F0
0830 IF F0>2 THEN 810
0840 LET F0=SGN(F0-1,5)
0850 IF FNR(1)=0 THEN 2000     0940
0860 IF FNR(2)=0 THEN 2000
0870 LET F=F0*SGN(A(1,N0+1)-A(1,N0+2))/2+1.5     0900
0880 IF F=1.5 THEN 910
0890 IF FNR(F)=0 THEN 2000
0900 GOTO 870
0910 LET N0=N0+1     0800
0920 LET A(2,N0)=A(3,N0)=0
0930 LET A(4,N0)=A(4,N0)-A(4,N0+1)
0940 GOTO 850
```

```
PROGRAMM FDIFF    24.11.85                    Seite  - 3 -

1000 REM *** FUNCTION READ FILE F
1010 DEF FNR(F)I
1020 LET FN=0
1030 IF F(F)=N(F) THEN 1090
1040 FOR I=1 TO M STEP 1
1050 READ :F,A(I,N0+F)
1060 NEXT I
1070 LET F(F)=F(F)+1
1080 LET FN=1
1090 FNEND      0 1030

2000 REM    ***   DATENAUSGABE   ↓   F3#     0850 0860 0890
2010 LET A$(2)=A$(3)=""
2020 PRINT N0;"KORRESPOND. PUNKTE NACH FILE "+F3$+" ";
2030 PRINT TAB(43);"DIFFERENZEN AUS FILE "+F1$+" - "+F2$
2035 PRINT TAB(43);"SORTIERUNG ("+CHR$((F2-1)*83+11)+")"
2040 DISP TAB(9);"SCRATCH",F3$
2050 FILE : 1,*
2060 FILE : 2,F3$
2070 SCRATCH :2
2080 WRITE :2,U1$,U7$,K0,U8$,K1,U9$,N0
2090 FOR I=1 TO M STEP 1
2100 WRITE :2,A$(I)
2110 NEXT I
2120 FOR J=1 TO N0 STEP 1
2130 FOR I=1 TO M STEP 1
2140 WRITE :2,A(I,J)
2150 NEXT I
2160 NEXT J
2170 FILE : 2,*
2180 GOTO 200
3000 END

*   ENDE PROGRAMM FDIFF   ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,      *
*  LISTEN:          steht am Sprungziel.                         *
*  ------------     0#: 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe       *
*                   rechtsbuendig, hierbei werden " ,)," ,       *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen          *
*                   Prioritaet benutzt.                          *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  F U S I O N                          Ausdruck vom 24.11.85
--------  -----------                          ---------------------
                                                          Seite  - 1 -

0010 REM FUSIOM ZWEIER DATENFILES (FORMAT MACH PROGR.INPUT)
0020 REM ------                 (STEIGENDE SEQUENZ DER X-WERTE)

0030 LET M=4
0040 DIM A(4,340), A$(4), B$(4)
0050 DCL $# U$(8,U29),  32 (A$(),B$()),  7 (F18,F28,F38)
0060 FILES =,#
0070 FKEY #1,1
0080 FKEY #2,2
0090 FKEY #3,3
0100 FKEY #0,.PUFFER.PUFFER

0200 REM **** START ****      #1670
0210 DISP "FILE#1 UND FILE#2 MACH FILE#3 ->    ODER (F#),
                                                .PUFFER.PUFFER ";
0220 INPUT F1$,F2$,F3$
0230 DISP F1$," + ",F2$,"-> ",F3$

0240 REM *** DATEN  <- F$ ***
0250 FILE   1,F1$
0260 FILE   2,F2$
0270 READ  1,U1$,U7$,K0,U0$,K1,U9$,M1
0280 READ  2,U2$,I$,K9,I$,K2,I$,M2
0285 LET F=1
0290 FOR I=1 TO M STEP 1
0300 READ  1,A$(I)
0310 READ  2,B$(I)
0320 IF A$(I)=B$(I) THEN 330
0325 LET F1=2
```

```
PROGRAMM FUSIOM    24.11.85                    Seite  - 2 -

0330 NEXT I      #320
0335 ON F1 GOTO 340,350
0340 IF K1=K2 THEN 460      #335
0350 FOR I=1 TO 20 STEP 1      #335
0360 BEEP
0370 DELAY 2
0380 NEXT I
0390 PRINT "PRUEFE OB FILES VERGLEICHBAR.",F1$,F2$
0400 PRINT "K0","K9","K1","K2"
0410 PRINT K0,K9,K1,K2
0420 FOR I=1 TO M STEP 1
0430 PRINT A$(I),"     ",B$(I)
0440 NEXT I
0450 STOP
0460 LET M=M1+M2      #340
0470 PRINT "GESAMT-M =";M
0480 PRINT U1$
0490 PRINT U2$
0500 DISP "UEBERSCHRIFT 1 ODER 2; NEU=F3 ";      #530
0510 INPUT I
0520 ON I GOTO 580,540,560
0530 GOTO 580
0540 LET U1$=U2$      #520
0550 GOTO 580
0560 DISP "UEBERSCHRIFT NEU:";      #520 #610
0570 RK0 U1$
0580 PRINT "UEBERSCHRIFT NEU:",U1$      #520 #550
0590 DISP "EINVERSTANDEN?   (JA) (NEIN) ";      #620
0600 INPUT I
0610 ON I GOTO 630,560
0620 GOTO 590
0630 LET F=1
0640 DISP F1$
0650 FOR J=1 TO M STEP 1
0660 IF J<>N1+1 THEN 690
0670 LET F=2
0680 DISP F2$
0690 FOR I=1 TO M STEP 1      #660
0700 READ  F,A(I,J)
0710 NEXT I
0720 NEXT J

1000 REM **** SORTIEREN MACH STEIG. A(1,1..M) ****
1010 DISP "SORTIEREN?  (JA) (NEIN)";      #1040
1020 INPUT F
1030 ON F GOTO 1050,1500
1040 GOTO 1010
1050 FOR J=1 TO M-1 STEP 1      #1030
1060 DISP "SORTIEREN:",M-J
1070 LET I1=J
1080 FOR I=J+1 TO M STEP 1
```

```
PROGRAMM FUSIOM    24.11.85                    Seite  - 3 -

1090 IF A(1,I1)<A(1,I) THEN 1110
1100 LET I1=I
1110 NEXT I      #1090
1120 FOR I=1 TO M STEP 1
1130 LET T2=A(I,I1)
1140 LET A(1,I1)=A(I,J)
1150 LET A(I,J)=T2
1160 NEXT I
1170 NEXT J
1180 DISP

1500 REM   ***   DATENAUSGABE   +   F3$      #1030
1510 LET U2$=F1$+" UND "+F2$+" MACH "+F3$
1520 PRINT "#","#","SORT#"+CHR$(74+4*(F-1)),U2$
1530 DISP TAB(9),"SCRATCH",F3$
1540 FILE : 1,#
1550 FILE   2,F3$
1560 SCRATCH  2
1570 WRITE  2,U1$,K0,U0$,K1,U9$,M
1580 FOR I=1 TO M STEP 1
1590 WRITE  2,A$(I)
1600 NEXT I
1610 FOR J=1 TO M STEP 1
1620 FOR I=1 TO M STEP 1
1630 WRITE  2,A(I,J)
1640 NEXT I
1650 NEXT J
1660 FILE : 2,#
1670 GOTO 200
2000 END

***  ENDE PROGRAMM FUSIOM   ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,      *
*  LISTEN:          steht am Sprungziel.                         *
*  ------------     0#: 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe       *
*                   rechtsbuendig; hierbei werden " ,)," ,       *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen          *
*                   Prioritaet benutzt.                          *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  M E D I A N                          Ausdruck vom 24.11.85
--------  -----------                          ---------------------
                                                          Seite  - 1 -

0010 REM **** MEDIANWERTE AUS FUSIONIERTEN FILES
0020 REM       MACH WUNSCH KLASSENBILDUNG

0030 LET M=4
0040 LET B=74
0050 LET T=6
0060 LET A2$="FALLZAHL"
0070 LET A3$="INTERQUARTIL 50"
0080 DIM A(4,300),  B(3),  A$(4)
0090 DCL $# U$,  7 (F1$,F2$)
0100 FILES =,#
0110 FKEY #1,1,1,1:
0120 FKEY #2,2,2,2:
0130 FKEY #3,3,3,3:

0500 REM **** START ****      #3530
0510 DISP "FUSIONS-FILE, MEDIANWERT-FILE ";
0520 INPUT F1$,F2$
0530 DISP "READ ",F1$,"SCRATCH ",F2$
0540 FILE : 1,F1$
0550 FILE : 2,F2$
0560 GOSUB 6000

1000 REM **** SORTIEREN MACH STEIG. A(M,F1..F2) ****
                                                          #3060
1010 LET N0=M1=F2=0
1020 LET N0=N0+1      #2130
```

```
1030 LET F1=F2+1
1040 FOR J=F1+1 TO M STEP 1
1050 IF A(1,F1)<>A(1,J) THEN 1070
1060 NEXT J
1070 LET F2=J-1      @1030
1080 FOR J=F1 TO F2-1 STEP 1
1090 DISP "SORTIEREN:",F2-J
1100 LET I1=J
1110 FOR I=J+1 TO F2 STEP 1
1120 IF A(M,I1)<=A(M,I) THEN 1140
1130 LET I1=I
1140 NEXT I      @1120
1150 FOR I=1 TO M STEP 1
1160 LET I2=A(1,I1)
1170 LET A(1,I1)=A(1,J)
1180 LET A(1,J)=I2
1190 NEXT I
1200 NEXT J
1210 DISP


2000 REM *** QUANTILE 0.25, 0.5, 0.75
2010 FOR I=1 TO 3 STEP 1
2020 LET J=I/4*(F2-F1+1)+F1-1
2030 LET I1=INT(J)+SGN(J-INT(J))
2040 LET I2=INT(J)+1
2050 LET Q(I)=(A(M,I1)+A(M,I2))/2
2060 NEXT I
2070 LET A(1,M0)=A(1,F1)
2080 LET A(2,M0)=F2-F1+1
2090 LET A(3,M0)=Q(3)-Q(1)
2100 LET A(4,M0)=Q(2)
2110 IF A(2,M0)<=M1 THEN 2130
2120 LET M1=A(2,M0)
2130 IF F2<M THEN 1020      @2110


3000 REM *** UEBERSICHT
3010 DISP "UEBERSICHT DRUCKEN  (JA) (NEIN)";
3020 INPUT F1
3030 ON F1 GOTO 3040,3050
3040 PRINT      @3030
3050 PRINT      @3030
3060 PRINT "M(";F18+") =";M,"M(";F28+") =";M0,"Max(Y)
                                                  ";M1
3070 ON F1 GOTO 3080,3300
3080 PRINT      @3070
3090 FOR J=M1 TO 1 STEP -1
3100 PRINT J;
3110 FOR I=1 TO M0 STEP 1
3120 LET I1=INT(B*(A(1,I)-A(1,1))/(A(1,M0)-A(1,1)))+T
3130 LET I2=45-3*SGN(SGN(A(2,I)-J)+1)
```



```
3140 PRINT TAB(I1);CHR$(I2);
3150 NEXT I
3160 NEXT J
3170 PRINT
3180 LET J=INT(LGT(A(1,M0)))
3190 FOR J=J TO 0 STEP -1
3200 FOR I=1 TO M0 STEP 1
3210 LET I1=INT(B*(A(1,I)-A(1,1))/(A(1,M0)-A(1,1)))+T
3220 LET I2=INT(A(1,I)/10^J)
3230 PRINT TAB(I1);
3240 IF (I2>0) OR (J=0) THEN 3270
3250 PRINT " ";
3260 GOTO 3300
3270 LET I2=I2/10      @3240
3280 LET I2=10*(I2-INT(I2))
3290 PRINT CHR$(48+I2);
3300 NEXT I      @3260
3310 NEXT J


3500 REM *** KLASSENBILDUNG?      @3070 @3540 @4100
3510 DISP "(WRITE)   (KLASSEN)   (NEU)";
3520 INPUT I
3530 ON I GOTO 4000,5000,500
3540 GOTO 3500


4000 REM **** WRITE MEDIANE -> F2# ****      @3530
4010 SCRATCH :2
4020 WRITE :2,"MEDIANE: "+U$,U7$,K$,U8$,K,U9$,M$
4030 WRITE :2,A$(1),A2$,A3$,A$(4)
4040 FOR J=1 TO M0 STEP 1
4050 FOR I=1 TO M STEP 1
4060 WRITE :2,A(I,J)
4070 NEXT I
4080 NEXT J
4090 PRINT "MEDIANWERTE AUS FILE "+F1$+" NACH "+F2$
4100 GOTO 3500


5000 REM *** KLASSEN      @3530
5010 PRINT
5020 DISP F1$+" NEU LESEN"
5030 GOSUB 6000
5040 DISP "UNTERGR., MITTE, OBERGR.  (END)";      @5090
                                                  @5100
5050 INPUT G0,G5,G9
5060 IF (G0<=G5) AND (G5<=G9) THEN 1000
5070 IF (G0<=G5) AND (G5<=G9) THEN 5100
5080 BEEP
5090 GOTO 5040
5100 LET I=0      @5070
```



```
5110 FOR J=1 TO M STEP 1
5120 IF (A(1,J)<G0) OR (A(1,J)>G9) THEN 5150
5130 LET A(1,J)=G5
5140 LET I=I+1
5150 NEXT J      @5120
5160 PRINT I,"MESSUNGEN IM BEREICH",G0,"BIS",G9,A0(1);
5170 PRINT ":   NEUE KLASSENMITTE =";G5
5180 GOTO 5040


6000 REM **** SUB READ DATA 4 F1$ ****      @560 @3030
6010 RESTORE :1
6020 READ :1,U$,U7$,K$,U8$,K,U9$,M
6030 FOR I=1 TO M STEP 1
6040 READ :1,A$(I)
6050 NEXT I
6060 FOR J=1 TO M STEP 1
6070 FOR I=1 TO M STEP 1
6080 READ :1,A(I,J)
6090 NEXT I
6100 NEXT J
6110 RETURN
7000 END


******  ENDE PROGRAMM MEDIAN  ******
```

```
*****************************************************
*
*  FORMATIERTES     $.... = Zeilennr. mit Sprungangabe,
*  LISTEN:          steht am Sprungziel.
*  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Rautezeichenausgabe
*                   rechtsbündig; hierbei werden " ;," 
*                   als Trennzeichen in der angegebenen
*                   Priorität benutzt.
*
*****************************************************


PROGRAMM  Q U A N T                    Ausdruck von 24.11.
--------  =========                    -------------------
                                                Seite - 1


0010 REM **** QUANTILE [25],[75] AUS FUSIONIERTEN FILES
0020 REM      NACH WUNSCH KLASSENBILDUNG

0030 LET M=4
0040 LET B=74
0050 LET T=6
0060 LET A2$="FALLZAHL"
0070 LET A3$="QUANTIL 25"
0080 LET A4$="QUANTIL 75"
0090 DIM A(4,300),  Q(3),  A$(4)
0100 DCL 00 U$,  7 (F1$,F2$)
0110 FILES *,*
0120 FKEY 1,1,1,1:
0130 FKEY 2,2,2,2:
0140 FKEY 3,3,3,3:


0300 REM **** START ****      @3530
0310 DISP "FUSIONS-FILE, QUANTILBER.-FILE ";
0320 INPUT F1$,F2$
0330 DISP "READ ";F1$,"SCRATCH ";F2$
0340 FILE : 1,F1$
0350 FILE : 2,F2$
0360 GOSUB 6000


1000 REM **** SORTIEREN NACH STEIG. A(M,F1..F2) ****
                                                  @30
1010 LET M0=M1=F2=0
```

```
1020 LET M0=M0+1      0 2130
1030 LET F1=F2+1
1040 FOR J=F1+1 TO M STEP 1
1050 IF A(1,F1)<A(1,J) THEN 1070
1060 NEXT J
1070 LET F2=J-1      0 1050
1080 FOR J=F1 TO F2-1 STEP 1
1090 DISP "SORTIEREN ",F2-J
1100 LET I1=J
1110 FOR I=J+1 TO F2 STEP 1
1120 IF A(M,I1)<=A(M,I) THEN 1140
1130 LET I1=I
1140 NEXT I      0 1120
1150 FOR I=1 TO M STEP 1
1160 LET I2=A(I,I1)
1170 LET A(1,I1)=A(I,J)
1180 LET A(I,J)=I2
1190 NEXT I
1200 NEXT J
1210 DISP


2000 REM *** QUANTILE 0.25, 0.5, 0.75
2010 FOR I=1 TO J STEP 1
2020 LET J=I/4*(F2-F1+1)+F1-1
2030 LET I1=INT(J)+SGN(J-INT(J))
2040 LET I2=INT(J)+1
2050 LET Q(I)=(A(M,I1)+A(M,I2))/2
2060 NEXT I
2070 LET A(1,M0)=A(1,F1)
2080 LET A(2,M0)=F2-F1+1
2090 LET A(3,M0)=Q(1)
2100 LET A(4,M0)=Q(3)
2110 IF A(2,M0)<M1 THEN 2130
2120 LET M1=A(2,M0)
2130 IF F2<M THEN 1020      0 2110


3000 REM *** UEBERSICHT
3010 DISP "UEBERSICHT DRUCKEN: (JA) (NEIN)";
3020 INPUT F1
3030 ON F1 GOTO 3040,3050
3040 PRINT      0 3030
3050 PRINT      0 3030
3060 PRINT "N(",F1$+") =",N,"M(",F2$+") =",M0,"M=max(Y)=
                                                    ",M1
3070 ON F1 GOTO 3080,3500
3080 PRINT      0 3070
3090 FOR J=M1 TO 1 STEP -1
3100 PRINT J,
3110 FOR I=1 TO M0 STEP 1
3120 LET I1=INT(8*(A(1,I)-A(1,1))/(A(1,M0)-A(1,1)))+T
```



```
3130 LET I2=43-3*SGN(SGN(A(2,I)-J)+1)
3140 PRINT TAB(I1),CHR$(I2);
3150 NEXT I
3160 NEXT J
3170 PRINT
3180 LET J=INT(LGT(A(1,M0)))
3190 FOR J=J TO 0 STEP -1
3200 FOR I=1 TO M0 STEP 1
3210 LET I1=INT(8*(A(1,I)-A(1,1))/(A(1,M0)-A(1,1)))+T
3220 LET I2=INT(A(1,I)/10^J)
3230 PRINT TAB(I1);
3240 IF (I2>0) OR (J=0) THEN 3270
3250 PRINT " ";
3260 GOTO 3300
3270 LET I2=I2/10      0 3240
3280 LET I2=10*(I2-INT(I2))
3290 PRINT CHR$(48+I2);
3300 NEXT I      0 3260
3310 NEXT J


3500 REM *** KLASSENBILDUNG?      0 3070 0 3540 0 4100
3510 DISP "(WRITE)   (KLASSEN)   (NEU)";
3520 INPUT I
3530 ON I GOTO 4000,5000,300
3540 GOTO 3500


4000 REM **** WRITE MEDIANE -> F2$ ****      0 3530
4010 SCRATCH :2
4020 WRITE :2,"QUANTILE: "+U$,U7$,K$,U8$,K,U9$,M$
4030 WRITE :2,A$(1),A2$,A3$,A4$
4040 FOR J=1 TO M0 STEP 1
4050 FOR I=1 TO M STEP 1
4060 WRITE :2,A(I,J)
4070 NEXT I
4080 NEXT J
4090 PRINT "QUANTILE AUS_FILE "+F1$+" NACH "+F2$
4100 GOTO 3500


5000 REM *** KLASSEN      0 3530
5010 PRINT
5020 DISP F1$+" NEU LESEN"
5030 GOSUB 6000
5040 DISP "UNTERGR., MITTE, OBERGR.  (END)";      0 5090
                                                    0 5100
5050 INPUT G0,G5,G9
5060 IF (G0=G5) AND (G5=G9) THEN 1000
5070 IF (G0<=G5) AND (G5<=G9) THEN 5100
5080 BEEP
5090 GOTO 5040
```



```
5100 LET I=0      0 5070
5110 FOR J=1 TO M STEP 1
5120 IF (A(1,J)<G0) OR (A(1,J)>G9) THEN 5130
5130 LET A(1,J)=G5
5140 LET I=I+1
5150 NEXT J      0 5120
5160 PRINT I,"MESSUNGEN IM BEREICH",G0,"BIS",G9,A$(1);
5170 PRINT "   NEUE KLASSENMITTE =",G5
5180 GOTO 5040


6000 REM **** SUB READ DATA + F1$ ****      0 5060 0 5030
6010 RESTORE :1
6020 READ :1,U$,U7$,K$,U8$,K,U9$,M
6030 FOR I=1 TO M STEP 1
6040 READ :1,A$(I)
6050 NEXT I
6060 FOR J=1 TO M STEP 1
6070 FOR I=1 TO M STEP 1
6080 READ :1,A(I,J)
6090 NEXT I
6100 NEXT J
6110 RETURN
7000 END


*** ENDE PROGRAMM QUANT  ******
```

```
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
+                                                           +
+  FORMATIERTES     0.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,  +
+  LISTEN:          steht am Sprungziel.                    +
+  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe  +
+                   rechtsbuendig; hierbei werden " ;," +
+                   als Trennzeichen in der angegebenen     +
+                   Prioritaet benutzt.                     +
+                                                           +
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```

```
PROGRAMM  A M S D                    Ausdruck vom 24.11.85
--------  -------                    ---------------------
                                                Seite - 1 -


0010 REM **** ARITHM. MITTELWERTE AUS FUSIONIERTEN FILES
0020 REM       NACH WUNSCH KLASSENBILDUNG

0030 LET N=4
0040 LET B=74
0050 LET T=6
0060 LET A2$="FALLZAHL"
0070 LET A3$="STANDARD-ABW"
0080 DIM A(4,300),  A$(4)
0090 DCL 80 U$,  7 (F1$,F2$)
0100 FILES *,*
0110 FKEY 0$1,1,1,1:
0120 FKEY 0$2,2,2,2:
0130 FKEY 0$3,3,3,3:


0140 REM **** START ****      0 3530
0150 DISP "FUSIONS-FILE, MITTELWERT-FILE ";
0160 INPUT F1$,F2$
0170 DISP "READ ";F1$,"SCRATCH ";F2$
0180 FILE : 1,F1$
0190 FILE : 2,F2$
0200 GOSUB 6000


1000 REM **** SUCHE GLEICHE X: A(M,F1..F2) ****      0 5060
1010 LET M0=M1=F2=0
1020 LET M0=M0+1      0 2130
1030 LET F1=F2+1
```

```
1040 FOR J=F1+1 TO M STEP 1
1050 IF A(1,F1)<>A(1,J) THEN 1070
1060 NEXT J
1070 LET F2=J-1      01050
1080 DISP "MITTELWERTE:",F1;"BIS",F2


2000 REM *** MITTELW + STANDARD-ABW ***
2005 LET M9=F2-F1+1
2010 LET X=X2=A(3,M0)=0
2015 FOR I=F1 TO F2 STEP 1
2020 LET X=X+A(M,I)
2025 LET X2=X2+A(M,I)↑2
2030 NEXT I
2035 LET I=X2-X↑2/M9
2070 LET A(1,M0)=A(1,F1)
2080 LET A(2,M0)=M9
2083 IF M9=1 THEN 2100
2085 LET A(3,M0)=SQR(I/(M9-1))
2100 LET A(4,M0)=X/M9      02085
2110 IF A(2,M0)<=M1 THEN 2130
2120 LET M1=M9
2130 IF F2<M THEN 1020      02110


3000 REM *** UEBERSICHT
3010 DISP "UEBERSICHT DRUCKEN: <JA> <NEIN>",
3020 INPUT F1
3030 ON F1 GOTO 3040,3050
3040 PRINT      03030
3050 PRINT      03030
3060 PRINT "N("+F1$+") =";M;"M("+F2$+") =",M0,"M=ax(Y1)
                                                    ",M1
3070 ON F1 GOTO 3080,3500
3080 PRINT      03070
3085 FOR J=M1 TO 1 STEP -1
3100 PRINT J;
3110 FOR I=1 TO M0 STEP 1
3120 LET I1=INT(B*(A(1,I)-A(1,1))/(A(1,M0)-A(1,1)))+T
3130 LET I2=<S-3+SGN(SGN(A(2,I)-J)+1)
3140 PRINT TAB(I1);CHR$(12);
3150 NEXT I
3160 NEXT J
3170 PRINT
3180 LET J=INT(LGT(A(1,M0)))
3190 FOR J=J TO 0 STEP -1
3200 FOR I=1 TO M0 STEP 1
3210 LET I1=INT(B*(A(1,I)-A(1,1))/(A(1,M0)-A(1,1)))+T
3220 LET I2=INT(A(1,I)/10↑J)
3230 PRINT TAB(I1);
3240 IF (I2>0) OR (J=0) THEN 3270
3250 PRINT " ";
```



```
3260 GOTO 3300
3270 LET I2=I2/10      03260
3280 LET I2=10*(I2-INT(I2))
3290 PRINT CHR$(48+I2);
3300 NEXT I      03260
3310 NEXT J


3500 REM *** KLASSENBILDUNG?      03070 03540 04100
3510 DISP "<WRITE>  <KLASSEN>  <NEU>".
3520 INPUT I
3530 ON I GOTO 4000,5000,500
3540 GOTO 3500


4000 REM **** WRITE MITTELWERTE -> F2$ ****      03530
4010 SCRATCH :2
4020 WRITE :2,"MITTEL: "+U$,U7$,K0,U8$,K,U9$,M0
4030 WRITE :2,A$(1),A2$,A3$,A$(4)
4040 FOR J=1 TO M0 STEP 1
4050 FOR I=1 TO M STEP 1
4060 WRITE :2,A(I,J)
4070 NEXT I
4080 NEXT J
4090 PRINT "MITTELWERTE AUS FILE "+F1$+" NACH "+F2$
4100 GOTO 3500


5000 REM *** KLASSEN      03530
5010 PRINT
5020 DISP F1$+" NEU LESEN"
5030 GOSUB 6000
5040 DISP "UNTERGR., MITTE, OBERGR.  <END>";      03090
                                                    03100
5050 INPUT G0,G5,G9
5060 IF (G0=G5) AND (G5=G9) THEN 1000
5070 IF (G0<>G5) AND (G5<>G9) THEN 5100
5080 BEEP
5090 GOTO 5040
5100 LET I=0      03070
5110 FOR J=1 TO M STEP 1
5120 IF (A(1,J)<G0) OR (A(1,J)>G9) THEN 5150
5130 LET A(1,J)=G5
5140 LET I=I+1
5150 NEXT J      03120
5160 PRINT I;"MESSUNGEN IM BEREICH";G0;"BIS";G9;A$(1);
5170 PRINT ";    NEUE KLASSENMITTE =";G5
5180 GOTO 5040


6000 REM **** SUB READ DATA 4 F1$ ****      03560 03030
6010 RESTORE :1
```



```
6020 READ :1,U8,U7$,K0,U8$,K,U9$,M
6030 FOR I=1 TO M STEP 1
6040 READ :1,A$(I)
6050 NEXT I
6060 FOR J=1 TO M STEP 1
6070 FOR I=1 TO M STEP 1
6080 READ :1,A(I,J)
6090 NEXT I
6100 NEXT J
6110 RETURN
7000 END


****** ENDE PROGRAMM AMSD ******
```

```
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
+                                                             +
+  FORMATIERTES     8.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,    +
+  LISTEN:          steht an Sprungziel,                      +
+  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Rostzeichenausgabe    +
+                   rechtsbundig, hierbei werden ",;)," als   +
+                   Trennzeichen in der angegebenen           +
+                   Priorität benutzt,                        +
+                                                             +
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```

PROGRAMM T T U N N Ausdruck vom 24.11.85

Seite - 1 -

```
0010 REM  VERBUNDENER T-TEST KORRESPONDIERENDER Y-WERTE

0015 REM                                          (R(M,*))
0020 REM  AUS 2 DATENFILES (FORMAT NACH PROGR.INPUT).
0030 REM  KORRESPOND:(Y1,Y2), WENN X1=X2;
0031 REM                  WEGFALL WENN X1<>X2.
0035 REM  EVTL. NORMALISIERUNG DER KOEFFIZIENTEN A0,B0
0036 REM  DER FUNKTIONEN A UND B AUS KURVENANPASSUNG
0040 LET M=4
0050 DIM A(4,300), F(2), N(2), A$(4), B$(4)
0060 DCL B8 (U16,U26),  32 (A$(),B$()),  7 (F16,F26)
0070 FILES *;*
0080 FKEY 01,1:
0090 FKEY 02,2:
0100 FKEY 03,3:


0200 REM **** START ****      02017 03170
0210 DISP "UT-TEST MIT FILE01, FILE02 ";
0220 INPUT F1$,F2$
0230 DISP "UT-TEST MIT "+F1$+", "+F2$


0300 REM *** DATEN  <- F$ ***
0310 FILE : 1,F1$
0320 FILE : 2,F2$
0330 READ :1,U16,U7$,K0,U8$,K1,U9$,M(1)
0340 READ :2,U26,I0,K9,I0,K2,I0,M(2)
0350 LET F1=1
0360 FOR I=1 TO M STEP 1
```

```
0370 READ  1.A8(I)
0380 READ  2.B8(I)
0390 IF A8(I)=B8(I) THEN 410
0400 LET F1=2
0410 NEXT I      0390
0420 ON F1 GOTO 430,440
0430 IF K1=K2 THEN 550      0420
0440 FOR I=1 TO 20 STEP 1      0420
0450 BEEP
0460 DELAY 2
0470 NEXT I
0480 PRINT "PRUEFE OB FILES VERGLEICHBAR ",F1$,F2$
0490 PRINT "K0","K9","K1","K2"
0500 PRINT K0,K9,K1,K2
0510 FOR I=1 TO M STEP 1
0520 PRINT A8(I),"      """"",B8(I)
0530 NEXT I.
0540 STOP
0550 LET N=N(1)+N(2)      0430
0560 LET N0=F(1)+F(2)=0
0565 PRINT
0566 PRINT
0570 PRINT U1$
0580 PRINT U2$
0590 DISP F1$,",",F2$,"  KOEFF. A0,B0",
0600 INPUT A0,B0
0610 IF (A0=1) AND (B0=1) THEN 800
0620 PRINT " ",TAB(1),"NORMALISIERUNG  ",F1$," /",A0,F2$,"
                                                          /",B0

0800 REM *** BEGINN VERGLEICH      0610
0810 DISP A$(1)+"   (&) oder (F)  SORTIERT";      0830
0820 INPUT F0
0830 IF F0>2 THEN 810
0835 DISP "FILES ",F1$,",",F2$," LESEN + VERGLEICHEN"
0840 LET F0=SGN(F0-1,5)
0850 IF FNR(1)=0 THEN 2000      0940
0860 IF FNR(2)=0 THEN 2000
0870 LET F=F0*SGN(A(1,N0+1)-A(1,N0+2))/2+1.5      0900
0880 IF F=1.5 THEN 910
0890 IF FNR(F)=0 THEN 2000
0900 GOTO 870
0910 LET N0=N0+1      0880
0920 LET A(2,N0)=A(N,N0)/A0
0930 LET A(3,N0)=A(N,N0+1)/B0
0940 GOTO 850

1000 REM *** FUNCTION READ FILE F
1010 DEF FNR(F)I
1020 LET FNR=0
```



```
1030 IF F(F)=M(F) THEN 1090
1040 FOR I=1 TO M STEP 1
1050 READ :F,A(I,N0+F)
1060 NEXT I
1070 LET F(F)=F(F)+1
1080 LET FN==1
1090 FNEND      01030

2000 REM *** BEGINN TEST MIT Y1=A(2,*) UND Y2=A(3,*),
                                  X=A(1,*)      0850 0860 0890
2005 DISP "T-TEST"
2010 LET S1=S2=S3=S4=S5=S6=0
2011 IF N0>2 THEN 2020
2012 PRINT " ",TAB(1);"TEST BEI FALLZAHL",N0,"NICHT
                                                  SINNVOLL!"
2015 BEEP
2017 GOTO 200
2020 FOR I=1 TO N0 STEP 1      02011
2021 LET S3=S3+A(2,I)
2022 LET S4=S4+A(3,I)
2023 LET S5=S5+A(2,I)↑2
2024 LET S6=S6+A(3,I)↑2
2025 LET D(I)=A(2,I)-A(3,I)
2030 LET S1=S1+D(I)
2040 LET S2=S2+D(I)↑2
2050 NEXT I
2060 LET F=N0-1
2061 LET V1=(S5-S3↑2/N0)/F
2062 LET V2=(S6-S4↑2/N0)/F
2063 LET V3=(S2-S1↑2/N0)/F
2065 LET S=SQR(V3/N0)
2066 LET M1=S3/N0
2067 LET M2=S4/N0
2068 LET M3=S1/N0
2069 IF S=0 THEN 3000
2070 LET T=M3/S
2075 LET T=ABS(T)

3000 REM *** AUSGABE      02069
3010 DISP
3050 PRINT
3060 PRINT
3070 PRINT A0(N)," Y1"," Y2","  d",A0(1)
3080 PRINT
3090 FOR I=1 TO N0 STEP 1
3100 PRINT "   0",I,A(2,I),A(3,I),D(I),A(1,I)
3110 NEXT I
3120 PRINT
3121 PRINT "MW.",M1,M2,M3
3122 PRINT "VAR ",V1,V2,V3
```



```
3123 LET M1=SQR(M1)
3124 LET V1=SQR(V1)
3125 LET V2=SQR(V2)
3126 LET V3=SQR(V3)
3127 PRINT "SD ",V1,V2,V3
3128 LET V1=V1/M1
3129 LET V2=V2/M1
3130 LET V3=V3/M1
3131 PRINT "SE ",V1,V2,V3
3135 PRINT
3136 IF S=0 THEN 3200
3139 PRINT USING 3220,T,F
3160 PRINT      03210
3165 PRINT
3170 GOTO 200
3200 PRINT "SD der Differenzen = 0 !"      03136
3210 GOTO 3160
3220     t =####.### ##:####### FG
4000 END

ENDE PROGRAMM TTUHW   ******
```

```
*****************************************************
*                                                   *
*  FORMATIERTES     0,... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,  *
*  LISTEN           stand an Sprungziel.             *
*  ------------     Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe  *
*                   rechtsbündig, hierbei werden " ,)," *
*                   als Trennzeichen in der angegebenen  *
*                   Priorität benutzt.                  *
*                                                       *
*****************************************************
```



```
0010 DCL B0I$      0110
0020 DISP "B1,Sy,x1,B2,Sy,x2,Q*1,Q*2,M1,M2";
0030 INPUT B1,S1,B2,S2,Q1,Q2,M1,M2
0040 LET T=ABS(B1-B2)/SQR(1/Q1+1/Q2)
0045 LET U=S1↑2*(M1-2)+S2↑2*(M2-2)
0046 LET U=U/(M1+M2-4)
0050 LET T=T/SQR(U)
0069  'CCCCCCCCCCCCC  !'CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC ! 'CCCCC !
                                          'CCCC ! 'CCC 'CCC 'CCC
0070 :###.### ###.### ! ##.###### ##.###### ! ##.### !
                                                  ##.## !#### #### ####
0080 PRINT USING
          69,"REGR.KOEFF","Sy.x","DIFF.","S","M1","M2","FG"
0090 PRINT USING 70,B1,B2,S1,S2,B1-B2,T,M1,M2,M1+M2-4
0100 PRINT
0110 GOTO 10
0120 END

ENDE PROGRAMM TTUREG   ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES      @.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,     *
*  LISTEN            steht am Sprungziel.                       *
*  -------------     Bei "LINE OVERFLOW" Restzeichenausgabe     *
*                    rechtsbuendig. hierbei werden " ;)," als   *
*                    Trennzeichen in der angegebenen            *
*                    Prioritaet benutzt.                        *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  P T F C                          Ausdruck vom 24.11.85
--------  -------                          ---------------------
                                                      Seite  - 1 -

0001 REM BERECHNUNG VON P-ALPHA AUS T UND FG
0010 DCL B0(15,A5,B6)
0020 PRINT
0030 PRINT
0040 PRINT "  t          Freiheitsgrade        P-alpha in
                                          %",TAB(72);"Kommentar"
0050 PRINT
0060 LET A$="88.888          888888          888;"      0270
0070 DISP "Nachkommastellen fuer P-alpha %",
0080 INPUT J
0090 FOR I=1 TO J STEP 1
0100 LET A$=A$+"9"
0110 NEXT I
0120 LET A$=A$+" "
0130 DISP "t, Freiheitsgrade",
0140 INPUT T,F
0150 DISP "Kommentar",
0160 RKB I0
0170 LET B$=A$
0180 IF LEN(I0)=0 THEN 220
0190 FOR I=1 TO B0-LEN(A$)-LEN(I0)-2 STEP 1
0200 LET B$=B$+","
0210 NEXT I
0220 LET B$=B$+" "          0100
0230 FOR I=1 TO LEN(I0) STEP 1
0240 LET B$=B$+"C"
0250 NEXT I
0260 PRINT USING B$,T,F,FNT(T,F)*100,I0
0270 GOTO 60
```

```
PROGRAMM PTFC    24.11.85                                Seite  - 2

0280 REM*
0290 REM  Berechnung von Irrtumswahrscheinlichkeit P
0300 REM  (fuer zweiseitigen Test) aus t und FG
0310 REM  Algorithmus BS3 aus Appl. Statist.

0320 REM*
0330 DEF FNT(T,F)
0340 LET A=T/SQR(F)
0350 LET B=F/(F+T*T)
0360 LET I2=F-2
0370 LET I1=F-2*INT(F/2)
0380 LET S=1
0390 LET C=1
0400 LET K1=2+I1
0410 LET K2=K1
0420 IF I2-2<0 THEN 480
0430 FOR K=K1 TO I2 STEP 2
0440 LET C=C*B*(K2-1)/K2
0450 LET S=S+C
0460 LET K2=K2+2
0470 NEXT K
0480 IF I1=1 THEN 510      0420
0490 LET P=0.5-0.5*A*SQR(B)+S
0500 GOTO 540
0510 IF F-1>1 THEN 530      0480
0520 LET S=0
0530 LET P=0.5-(A*B*S+ATN(A))*.3183098862      0510
0540 LET FN=2*P      0500
0550 FNEND
0560 END

*  ENDE PROGRAMM PTFC  ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES      @.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,     *
*  LISTEN            steht am Sprungziel.                       *
*  -------------     Bei "LINE OVERFLOW" Restzeichenausgabe     *
*                    rechtsbuendig. hierbei werden " ;)," als   *
*                    Trennzeichen in der angegebenen            *
*                    Prioritaet benutzt.                        *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  F M I X                          Ausdruck vom 24.11.85
--------  -------                          ---------------------
                                                      Seite  - 1 -

0100 DIM A(10 20), B(10,20), A$(10), B$(10)
0110 DCL B0 (U0,10), 32 (A0()),B0()
0115 BUFFER 032:80
0120 FILES =
0130 FKEY 01,-1,-1
0140 FKEY 02,-2,-2
0150 FKEY 03,-3,-3
0160 FKEY 04,-4,-4
0170 FKEY 05,-5,-5
0500 REM START     0570
0505 DISP "WIEVIEL ZEILEN,SPALTEN ";
0506 INPUT L9,M9
0550 DISP "<MAN><FILE><TRANS><WRITE><START>";      0590 0855
          0895 01006 01070 02225 02316 02400 03100 03260
0560 INPUT I,I
0570 ON -I GOTO 800,2200,1000,3000,500
0580 BEEP
0590 GOTO 550
0600 REM MAN     0570
0610 DISP "ZEILE ",
0620 INPUT Z2
0630 IF (Z2<1) OR (Z2>L9) THEN 1065
0640 DISP "ZEILE";Z2;":  TEXT ";
0650 RKB I0
0655 IF I0=="" THEN 550
0656 LET B0(Z2)=I0
0660 FOR J=1 TO M9 STEP 1
0670 DISP J,
0680 INPUT B(Z2,J)
0690 NEXT J
0695 GOTO 550
```

```
PROGRAMM FMIX    24.11.85                                Seite  - 2

1000 REM TRANS      0570 01061
1004 DISP "ZEILE ,, AUF ,,     ODER <ENDE> ",
1005 INPUT Z1,Z2
1006 IF (Z1<Z2) AND (Z1<-1) THEN 550
1007 IF (Z1<1) OR (Z1>L0) THEN 1065
1008 IF (Z2<1) OR (Z2>L9) THEN 1065
1010 SEND A$0,A$(Z1)
1020 CMD B$0,1
1030 RECEIVE 032,B$(Z2)
1040 FOR I=1 TO M9 STEP 1
1050 LET B(Z2,I)=A(Z1,I)
1060 NEXT I
1061 GOTO 1000
1065 GOSUB 4800      0830 01007 01000
1070 GOTO 550
2200 REM FILE      0570
2210 DISP "READ FILE ";
2220 RKB F$
2225 IF F$=="" THEN 550
2290 DISP "****  ";F$;"  ****"
2292 LET L0=4
2300 FILE   1,F$
2301 DISP "****  ";F$;" WIRD GELESEN  ****"
2310 READ  1,10,150,1,168,1,170,M
2311 IF M9=M THEN 2320
2312 DISP F$;":";M;"SPALTEN!"
2313 BEEP
2314 DELAY 20
2315 GOSUB 4810
2316 GOTO 550
2320 GOSUB 4300      02311
2321 FOR I=1 TO L0 STEP 1
2330 READ :1,A(I)
2340 NEXT I
2350 FOR J=1 TO M STEP 1
2360 FOR I=1 TO L0 STEP 1
2370 READ :1,A(I,J)
2380 NEXT I
2390 NEXT J
2400 GOTO 550
3000 REM WRITE      0570
3010 DISP "WRITE FILE ";
3011 RKB F$
3012 IF F$=="" THEN 3250
3015 DISP "FILE ";F$;" NEU BESCHR.: (J)<M>";
3016 INPUT I,I
3017 IF I<>-1 THEN 3250
3018 DISP F$
3020 FILE  1,F$
3050 DISP F$;" UEBERSCHRIFT",
3060 RKB U$
3061 IF U$<>"" THEN 3060
```

```
3062 DISP F$," WIRD NICHT BESCHRIEBEN!"      03072
3063 BEEP
3064 DELAY 15
3065 GOTO 3254
3068 READ  1,I$ EOF 3074      03061
3069 GOSUB -802
3070 DISP "FILE ",F$," UEBERSCHR.: (J)<M)",
3071 INPUT I,I
3072 IF I<>-1 THEN 3062
3074 BUILD I$,L9      03069
3075 DISP "### ",F$," WIRD BESCHRIEBEN ###"
3076 SCRATCH  1
3077 WRITE  1,U$,I$,I,I$,I,I$,M9
3080 FOR I=1 TO L9 STEP 1
3090 WRITE  1,B$(I)
3100 NEXT I
3110 FOR J=4 TO M9 STEP 1
3120 FOR I=1 TO L9 STEP 1
3130 WRITE  1,B$(I,J)
3140 NEXT I
3150 NEXT J
3160 DISP "<WEITER> (AUSDRUCK)";      03195
3170 INPUT I
3180 ON -I GOTO 550,3200
3190 BEEP
3195 GOTO 3160
3200 DISP "CHAIN FPRTAB"      03100
3210 CHAIN "FPRTAB"
3250 DISP "DATEN WERDEN NICHT GESPEICHERT!"      03012 03017
                                                      03065
3251 BEEP
3252 DELAY 15
3253 GOSUB -810
3260 GOTO 550
4000 DISP "  ####   EINGABEFEHLER!   ####  "      01063
4001 GOTO 4010
4002 DISP "    ####   ACHTUNG !!   ####  "      03069
4003 GOTO 4010
4010 FOR I=1 TO 8 STEP 1      02315 03255 04001 04003
4020 BEEP
4030 DELAY 1
4040 NEXT I
4050 RETURN


4500 REM *** TEST I$# ***      02320
4510 IF I$#<>16# THEN 4590
4511 IF I$#<>17# THEN 4590
4520 CONVERT I$# TO F LENGTH L
4530 IF (F(1)<>32) OR (F(L)<>32) THEN 4550
4535 IF L<3 THEN 4590
4540 FOR J=2 TO L-1 STEP 1
```



```
4550 LET X=F(J)
4560 IF (X<48) OR (X>57) THEN 4590
4570 NEXT J
4580 ASSIGN I$,L8,0
4590 RETURN      04510 04511 04530 04535 04560
5000 END


*  ENDE PROGRAMM FMIX   ******
```

```
*****************************************************************
*                                                               *
*  FORMATIERTES      8.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,     *
*  LISTEN.           steht als Sprungziel.                      *
*  ------------      Bei "LINE OVERFLOW" Restzeichenausgabe     *
*                    rechtsbündig, hierbei werden " ;)," als    *
*                    als Trennzeichen in der angegebenen        *
*                    Priorität benutzt.                         *
*                                                               *
*****************************************************************
```

```
PROGRAMM  F P R T A B                    Ausdruck von 24.11.85
--------  ===========                    ---------------------
                                                     Seite  - 1 -


0100 DIM A(10,20), A$(10), F(80), F$(20)
0110 DCL 80 (U$,I$,100),  13 F$(),  32 A$()
0120 FILES *
0130 FKEY 80,4
0131 FKEY 87,44
0200 GOTO 2230


1000 REM ***      02235 02301 02311 02341 02351 03001 03041
                  03081 03271 03601 03701 03711 04001 03025 03040
1010 TEST 032
1020 ON IOC(0)+1 GOTO 1040,1150
1040 RECEIVE 032,I# AND GO      01020
1041 DISP " FILE ?"      01110
1042 BEEP
1050 IF I$="#" THEN 1150
1052 LET L9#=""
1054 IF SCN(I$,"#",1,1)=0 THEN 1070
1056 ASSIGN I$,I$,L9$,64
1070 GOSUB 2040      01034
1080 IF LEN(I$)<0 THEN 1120
1090 LET I=LEN(I$)-30
1092 DSP I$,TAB(31+I+SCN(SCN(I$)+1)),"-b";TAB(56);
1100 LET I$="0"
1110 GOTO 1041
1120 LET M=M+1      01080
1130 LET F$(M)=I$
1132 IF L9#="" THEN 1140
1134 LET F$(M)=F$(M)+"#"+L9$
1140 LET I$="0"      01132
1150 RETURN      01020 01030
```



```
2040 REM *** FILENAME ***      01070
2045 LET F(1)=0
2050 GOTO 2110
2060 LET I$="INCORRECT FILENAME "+I$      02150 02155 02160
                                                      02210
2070 BEEP
2100 RETURN
2110 IF I$="4" THEN 2225      02050
2111 IF I$<>"44" THEN 2119
2112 CHAIN "FPRTAB"
2119 CONVERT I$ TO F LENGTH L      02111
2120 LET F=1
2130 IF (F(1)=42) OR (F(1)=43) THEN 2150
2140 LET F=0
2150 IF L>6+F THEN 2060      02130
2155 IF L=F THEN 2060
2160 IF (F(F+1)<65) OR (F(F+1)>90) THEN 2060
2170 FOR I=F+2 TO L STEP 1
2180 LET X=F(I)
2190 IF (X>64) AND (X<91) THEN 2220
2200 IF (X>47) AND (X<58) THEN 2220
2210 GOTO 2060
2220 NEXT I      02190 02200
2225 RETURN      02110


2230 REM *** AUSDRUCK ***      0200
2231 BUFFER 032,80
2232 LET M=0
2233 LET I$="0"
2233 GOSUB 1000      02236
2236 IF M=0 THEN 2235      02270
2237 IF F$(1)="4" THEN 5000
2240 GOSUB 2290
2245 GOSUB 4000
2250 FOR I=2 TO M STEP 1
2255 LET F$(I-1)=F$(I)
2260 NEXT I
2265 LET M=M-1
2270 GOTO 2236


2290 REM *** OPEN  <- F$ ***      02240
2292 LET L$=4
2293 LET I$=F$(1)
2294 IF SCN(I$,"#",1,1)=0 THEN 2300
2296 ASSIGN I$,F$,L$,64
2300 FILE  1,I$      02294
2301 GOSUB 5000
2310 READ  1,U$,I$,F$,K,L$,M
```

```
2311 GOSUB 1000
2315 GOSUB 2500
2320 FOR I=1 TO L0 STEP 1
2330 READ 'I,A$(I)
2340 NEXT I
2341 GOSUB 1000
2350 FOR J=1 TO M STEP 1
2360 FOR I=1 TO L0 STEP 1
2370 READ  I,A(I,J)
2380 NEXT I
2390 NEXT J
2391 GOSUB 1000
2400 RETURN


2500 REM *** TEST I$# ***      #2315
2510 IF I$#<>I6# THEN 2590
2511 IF I$#<>I7# THEN 2590
2520 CONVERT I$# TO F LENGTH L
2530 IF (F(1)<>32) OR (F(L)<>32) THEN 2590
2535 IF L<3 THEN 2590
2540 FOR J=2 TO L-1 STEP 1
2550 LET X=F(J)
2560 IF (X<48) OR (X>57) THEN 2590
2570 NEXT J
2580 ASSIGN I$#,L8,0
2583 IF SCM(I98,"3",1,1)0 THEN 2590
2586 LET F6(1)=F6(1)+"3"+I$#
2590 RETURN      #2510 #2511 #2530 #2535 #2560 #2583


3000 REM *** SUB AUSDRUCK TABELLE   ******      #4070 #4090
3001 GOSUB 1000
3010 PRINT
3020 PRINT
3030 PRINT
3032 LET I9$=F6(1)
3034 IF SCM(I9$,"3",1,1)=0 THEN 3040
3036 ASSIGN I9$,I9$:L9,64
3040 PRINT "FILE "+I9$,"ZL =";L9      #3034
3041 GOSUB 1000
3050 PRINT
3060 PRINT U$
3081 GOSUB 1000
3120 PRINT      #4070 #4090
3200 PRINT
     FNZ$(M2-M1,3,"","","T","|----------------T","-----!")
3271 GOSUB 1000
3310  '!'LLLLLLLLLLLLLLL!
3375 LET
     I0$=FNZ$(M2-M1+1,3,"-","","|" "|----------------!","")
3390 FOR J=1 TO L9 STEP 1
```



```
3400 BUILD USING 3310,I$,A$(J)
3420 FOR I=M1 TO M2 STEP 1
3430 LET X=A(J,I)
3440 REM IF J>1 THEN 3460
3450 IF (X>0) AND (X<.1) THEN 3610
3460 IF X>=1E4 THEN 3610
3470 IF ABS(X)>=1 THEN 3520
3471 IF X<>0 THEN 3480
3472 LET I1$="    0!"
3473 GOTO 3660
3480 BUILD USING 3490,I1$,X      #3471
3490  ##.###
3500 LET I1$=REP$(I1$,"0","","1,1)+"!"
3510 GOTO 3660
3520 LET I1=5*10↑(INTLGT(ABS(X)))-3)*SGN(X)      #3470
3530 LET I1=4-INTLGT(ABS(X+I1)))
3531 IF I1>0 THEN 3540
3532 LET I1=1
3540 LET I2=I1+4      #3531
3550 LET I2$=EXT$("#####.##",I1,I2)+"!"
3580 BUILD USING I2$,I1$,X
3590 GOTO 3660
3610 BUILD USING 3620,I1$,X      #3450 #3460
3620  ##.#####
3630 LET I1$=REP$(I1$," ","",1,1)
3640 LET I1$=REP$(I1$,"E-0","-",1,1)
3650 LET I1$=REP$(I1$,"E+0","+",1,1)+"!"
3660 LET I$=I$+I1$      #3473 #3510 #3590
3670 NEXT I
3680 PRINT I$
3681 GOSUB 1000
3690 IF J<L9 THEN 3701
3700 LET
     I0$=FNZ$(M2-M1,3,"-","","|","|----------------!",
                                                    "-----!")
3701 GOSUB 1000      #3690
3710 PRINT I0$
3711 GOSUB 1000
3720 NEXT J
3730 RETURN


4000 REM ***  SUBROUTINE FUER   *****      #2245
4001 GOSUB 1000
4010 REM        AUFRUF DER TABELLEN-SUBROUTINE IM
                                                ZEHNERGRUPPEN
4015 LET L9=4
4020 LET Z=0
4030 LET M1=Z*10+1      #4110
4040 LET M2=Z*10+10
4050 IF M2<M THEN 4090
4060 LET M2=M
```



```
4070 ON SGN(Z)+1 GOSUB 3000,3120
4080 RETURN
4090 ON SGN(Z)+1 GOSUB 3000,3120      #4050
4100 LET Z=Z+1
4110 GOTO 4030


4120 REM *** SUB STRING ) 16 ***
4130 DISP "EINGABE ZU LANG  (MAX.16)"
4140 FOR I=1 TO 3 STEP 1
4150 BEEP
4160 DELAY 1
4170 NEXT I
4180 DELAY 10
4190 RETURN


4200 REM *** FNZ$ ***
4201 DEF FNZ$(N,M,I$,I1$,I2$,J1$,J2$)I,F$,F1$
4202 DCL 80 (F$*6,F$,F1$)
4203 LET F$=""
4204 FOR I=1 TO M STEP 1
4205 LET F$=F$+I1$
4206 NEXT I
4207 LET F$=I$+F$+I2$
4208 LET F1$=""
4209 FOR I=1 TO M STEP 1
4210 LET F1$=F1$+F$
4211 NEXT I
4212 LET FN$=J1$+F1$+J2$
4213 FNEND


4214 REM ******


5000 REM *** ENDE ***      #2237
5010 FOR I=1 TO 10 STEP 1
5020 PRINT
5025 GOSUB 1000
5030 NEXT I
5040 GOSUB 1000
5050 IF M<2 THEN 5080
5051 IF F$(2)<>"4" THEN 5060
5055 DISP "CHAIN FMIX"
5056 CHAIN "FMIX"
5058 DISP "CHAIN ";F$(2)      #5051
5070 CHAIN F$(2)
5080 CMD #40,16      #5030
5085 SEND #40,"LDK"
5090 CMD #40,1
5100 END
```

```
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
+                                                           +
+  FORMATIERTES    @.... = Zeilennr. mit Sprunganweisung,   +
+  LISTEN:         steht am Sprungziel.                     +
+  ------------    Bei 'LINE OVERFLOW' Restzeichenausgabe   +
+                  rechtsbuendig, hierbei werden " ;)," ,   +
+                  als Trennzeichen in der angegebenen      +
+                  Prioritaet benutzt.                      +
+                                                           +
+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
```

```
PROGRAMM   P L I S T                    Ausdruck vom 24.11.85
-------   ---------                     ---------------------
                                                  Seite  - 1 -


0010 REM FORMATIERTES LISTEN VOM PROGRAMMEN
0015 REM        MIT SPRUNGZIELMARKIERUNG
0020 REM ---------------------------------

0030 DIM L(600,2)
0040 DCL SINGLE
0050 DCL 120 (I$,Z$),   80 (I1$,U$,V1$),   1 (T$,U2$)
0060 DEF FNT$=CHR$(43-(ABS(SGN(INT(Z9/2)-20))+(-1)*13)
0070 LET Z9=60
0080 LET S0=1
0090 LET S9=60
0095 LET T$=29
0100 LET V0=0
0110 LET S0$="Seite  -"
0125 PAD V1$,43
0126 LET V2$=EXT$(V1$,1,1)
0130 PAD U$,43
0140 LET T1$=" ;)."
0150 FKEY 01,1:
0160 FKEY 02,2:
0170 FKEY 03,3:
0180 FKEY 04,4:
0190 FKEY 05,0,9999,0,9999:
0200 FILES *,+FLKMF


0500 REM **** ABFRAGE ****      #040
0510 SCRATCH  2
0520 LET Z0$=" "      #040
0530 LET L9=29
0540 LET F0=2      #070
```

```
0550 DISP "FILE=?     <O# END OF LINE>";
0560 KB 20$
0570 IF F$="" THEN 800
0580 DISP "TEST VON,BIS  LIST V,B  <O#:F$>";
0590 INPUT T1,T2,L1,L2
0600 DISP "AUSGABE  (PROGRAM)(LABELS)(P&L)";      0630
0610 INPUT F1
0620 ON F1 GOTO 640,640,640
0630 GOTO 600
0640 DISP "LISTEN  (NORMAL) (FORMATIERT) ";      0620 0620
                                                  0620 0670
0650 INPUT F9
0660 ON F9 GOTO 790,680
0670 GOTO 640
0680 DISP "PROGRAMMNAME, HEUTIGES DATUM ";      0660
0690 INPUT P$,D$
0700 DISP "LETZTE SEITE AUFFUELLEN        -> AB ? % BELEGTEN
                                                  ZEILEN      ";
0710 INPUT L9
0720 DISP "LEERZEILENMARKE: (JA)(NEIN)";      0730 0700
0730 INPUT F8
0740 ON F8 GOTO 760,790
0750 GOTO 720
0760 DISP "LEERZEILE VOR MARKE=";      0740
0770 KB 20$
0780 IF Z0$="" THEN 720
0790 PRINT F$,P$,D$,Z0$      0660 0740
0800 PRINT "TEST VON";T1,"BIS",T2,"LIST VON",L1,"BIS",L2
0810 PRINT "% =",L9,"AUSGABE =",F1,CHR$(78-8*(F9-1))+"ORM"
0820 DISP "EINVERSTANDEN  (JA)(NEIN)(NEU)";      0850
0830 INPUT I
0840 ON I GOTO 860,520,500
0850 GOTO 820
0860 WRITE  2,F$,P$,D$,Z0$,T1,T2,L1,L2,Z9*L9/100,F1,F8,F9
                                                  0840
0865 PRINT U$
0870 GOTO 540
0880 RESTORE  2      0570
0890 PRINT U$,U$,U$


1000 REM *** START ***      07010 07100
1010 READ  2,F$,P$,D$,Z0$,T1,T2,L1,L2,L9,F1,F8,F9 EOF 8000
1020 LET M=0
1030 LET S0=1
1040 LET F5=2
1050 LET U$=(F9-1)*U0
1060 LET U$=""
1070 FOR I=1 TO U STEP 1
1080 LET U$=U$+" "
1090 NEXT I
1100 FILE   1,F$
```



```
1110 PRINT "FILE ";F$,
1120 PRINT "TEST VON",T1;"BIS";T2,
1130 IF F1=2 THEN 2000
1140 PRINT "LIST VON",L1,"BIS";L2,
1150 PRINT
1160 PRINT
1170 IF F9=1 THEN 2000


1180 REM *** KOPF AUSDRUCK ***
1190 LET I$="AUSDRUCK VOM ";D$
1200 LET J=LEN(I$)
1210 PRINT U$
1220 PRINT
1221 PRINT
1222 PRINT
1225 PRINT TAB(U0+2);EXT$(U1$,U0+2,S9+1)
1226 PRINT TAB(U0+2);U2$,TAB(S9+1);U2$
1230 PRINT TAB(U0+2),U2$+"  FORMATIERTES";
1240 PRINT TAB(T5);"B.... = Zeilennr. mit
                          Sprunganweisung.",TAB(S9+1);U2$
1250 PRINT TAB(U0+2),U2$+"  LISTEN.";
1251 PRINT TAB(T5);"steht am Sprungziel.";TAB(S9+1);U2$
1259 PRINT TAB(U0+2);U2$+"  ------------";
1260 PRINT TAB(T5);"B** 'LINE OVERFLOW'
                          Reaktionsmeldung; hierbei
                                                  werden ";
1262 PRINT CHR$(34)+T1$+CHR$(34),TAB(S9+1),U2$
1263 PRINT TAB(U0+2);U2$,TAB(T5);"als Trennzeichen in der
                                                  angegebenen";
1264 PRINT TAB(S9+1),U2$
1265 PRINT TAB(U0+2);U2$,TAB(T5),"Priorität
                                  benutzt.",TAB(S9+1);U2$
1268 PRINT TAB(U0+2);U2$,TAB(S9+1),U2$
1269 PRINT TAB(U0+2);EXT$(U1$,U0+2,S9+1)
1270 FOR I=1 TO 6 STEP 1
1280 PRINT
1290 NEXT I
1300 PRINT TAB(U0+2);"PROGRAMM  ";
1310 FOR I=1 TO LEN(P$) STEP 1
1320 PRINT EXT$(P$,I,1)+" ";
1330 NEXT I
1340 PRINT TAB(S0+S9+1-J),I$
1350 PRINT TAB(U0+2);"--------  ";
1360 FOR I=1 TO 2*LEN(P$)-1 STEP 1
1370 PRINT "=";
1380 NEXT I
1390 PRINT TAB(S0+S9+1-J),
1400 FOR I=1 TO J STEP 1
1410 PRINT "";
1420 NEXT I
```



```
1430 PRINT
1450 LET I$=S0$+" 1 -"
1460 PRINT TAB(S0+S9+1-LEN(I$)),I$
1470 PRINT
1475 PRINT
1476 PRINT
1480 LET Z0=25


2000 REM **** READ LINE ****      01130 01170 02060 02110
                                                  02200 03000
2010 READ  1,I$ EOF 4000
2020 DISP I$
2030 LET I1$=EXT$(I$,1,4)
2040 ASSIGN I1$,I2,0
2050 IF I2>T2 THEN 4000
2060 IF I2<T1 THEN 2000
2070 DATA LE,REM,AT
2080 RESTORE
2090 FOR I=1 TO 3 STEP 1
2100 READ I1$
2110 IF SCM(EXT$(I$,5,8),I1$,1,1)<>0 THEN 2000
2120 NEXT I
2130 DATA THEN,GOTO,GOSUB,EOF
2140 LET H1=1
2150 FOR I=1 TO 4 STEP 1
2160 READ I1$
2170 LET J=SCM(I$,I1$,H1,5)      02260
2180 IF J=0 THEN 2270
2190 LET H0=0
2200 FOR H=5 TO J-1 STEP 1
2210 IF EXT$(I$,H,H)<>CHR$(34) THEN 2230
2220 LET H0=H0+.5
2230 NEXT H      02210
2240 IF H0-INT(H0)=0 THEN 3000
2250 LET H1=H1+1
2260 GOTO 2170
2270 NEXT I      02180
2280 GOTO 2000


3000 REM **** ZEILE L = SPRUNGANWEISUNG ****      02240
3010 LET I$=EXT$(I$,J+LEN(I1$),LEN(I$))
3020 ASSIGN I$,I1$:44      03100
3030 ASSIGN I$,I1:44
3040 LET M=M+1
3050 LET L(M,1)=I1
3060 LET L(M,2)=I2
3070 LET I$=REP$(I$,I1$,"",1,1)
3080 IF LEN(I$)=0 THEN 2000
3090 LET I$=REP$(I$,",","",1,1)
3100 GOTO 3020
```



```
4000 REM **** SORTIEREN ****      02010 02050
4010 FOR J=1 TO M-1 STEP 1
4020 DISP "SORTIEREN.",M-J
4030 LET I1=J
4040 FOR I=J+1 TO M STEP 1
4050 IF L(I1,1)=1E4+L(I1,2)<=L(I,1)=1E4+L(I,2) THEN 4070
4060 LET I1=I
4070 NEXT I      04050
4080 FOR I=1 TO 2 STEP 1
4090 LET I2=L(I1,I)
4100 LET L(I1,I)=L(J,I)
4110 LET L(J,I)=I2
4120 NEXT I
4130 NEXT J
4140 DISP


5000 REM **** AUSGABE PROGRAM ****
5010 IF F1=2 THEN 7000
5020 LET I=1
5030 RESTORE  1
5040 READ  1,I$ EOF 6500      05070
5050 LET I1$=EXT$(I$,1,4)      05930
5060 ASSIGN I1$,L,0
5070 IF L<L1 THEN 5040
5080 IF L>L2 THEN 6550
5090 LET F2=F4=0
5100 LET Z$=U$      05710
5110 LET Z$=Z$+I$      05240
5120 LET Z=LEN(Z$)
5130 IF Z>59 THEN 5300
5140 IF I>M THEN 5800      05240
5150 LET F3=SGN(L-L(I,1))
5160 ON F3+2 GOTO 5800,5170,5220
5170 BUILD I$,L(I,2)      05160
5180 LET I$=REP$(I$," ","0",1,1)
5190 ON F2 GOTO 5220
5200 LET I$="      "+I$
5210 LET F2=1
5220 REM NEXT LABEL      05160 05190
5230 LET I=I+1
5240 ON F3+1 GOTO 5110,5140


5300 REM *** TEILAUSDRUCK      05130
5310 LET F4=1
5320 FOR J=1 TO LEN(T1$) STEP 1
5330 LET T$=EXT$(T1$,J,J)
5340 LET P0=V+3
5350 LET P=SCM(Z$,T$,1,P0+1)      05300
```

```
5560 IF (P=U) OR (P>S9) THEN 5590
5570 LET P0=P
5580 GOTO 5550
5590 IF P0>V+3 THEN 5620      #5560
5600 NEXT J
5610 LET P0=S9
5620 LET I1$=EXT$(Z$,1,P0)      #5590
5630 ON F0 GOTO 5640,5680
5640 IF SCN(I1$,"REM",1,1)=0 THEN 5680      #5630
5650 IF SCN(I1$,Z0$,1,U)=0 THEN 5680
5655 PRINT FNT$
5660 GOSUB 6000
5665 PRINT FNT$
5670 GOSUB 6000
5680 PRINT FNT$;I1$      #5630 #5640 #5650
5690 GOSUB 6000
5700 LET I$=" ,  . "+EXT$(Z0,P0+1,Z)
5710 GOTO 5100


5800 REM *** AUSGABE ZEILE bzw. FOLGEZEILE      #5140 #5160
5810 IF F4=0 THEN 5840
5820 PRINT FNT$,TAB(S8+S9+1-Z);Z$
5830 GOTO 5900
5840 ON F0 GOTO 5850,5890      #5810
5850 IF SCN(Z$,"REM",1,U)=0 THEN 5890      #5840
5860 IF SCN(Z$,Z0$,1,U)=0 THEN 5890
5865 PRINT FNT$
5870 GOSUB 6000
5875 PRINT FNT$
5880 GOSUB 6000
5890 PRINT FNT$,Z$      #5840 #5850 #5860
5900 LET I$=""      #5830
5910 READ #1,I$ EOF 5920
5920 GOSUB 6000      #5910
5930 ON SGN(LEN(I$))+1 GOTO 6500,5950


6000 REM ****  SUB SEITENEINTEILUNG  ****      #5660 #5670
                                              #5690 #5870 #5880 #5920
6010 LET Z0=Z0+1
6020 IF (Z0<Z9-4) OR (F9=1) THEN 6260
6030 IF I$="" THEN 6260
6040 LET S0=S0+1
6050 BUILD I1$,"-",S0,"-"
6060 PRINT
6061 PRINT
6062 PRINT
6070 PRINT TAB(S8+S9+1-LEN(I1$)),I1$
6200 PRINT U$
6210 PRINT TAB(V0+2),"PROGRAMM ";P$;"     ";D$;
6220 BUILD I1$,S0$,S0,"-"
```



```
6230 PRINT TAB(S8+S9+1-LEN(I1$));I1$
6240 PRINT
6241 PRINT
6242 PRINT
6250 LET Z0=4
6260 RETURN      #6020 #6030


6500 REM *** AUSDRUCK ENDE      #5040 #5930
6510 PRINT FNT$
6511 LET Z0=Z0+1
6512 PRINT FNT$
6513 LET Z0=Z0+1
6514 PRINT FNT$
6520 PRINT "******   ENDE PROGRAMM ";P$;"   ******"
6540 LET Z0=Z0+2
6550 IF F9=1 THEN 7000      #5000
6560 IF S0=1 THEN 6570
6565 IF Z0<L9 THEN 6600
6570 FOR Z0=Z0 TO Z9-1 STEP 1      #6560
6580 PRINT FNT$
6590 NEXT Z0
6600 PRINT U$      #6565


7000 REM **** AUSGABE LIST OF LABELS ****      #5010 #6550
7010 IF F1=1 THEN 1000
7020 PRINT
7030 PRINT
7040 PRINT "LIST OF LABELS"
7050 PRINT
7060 FOR I=1 TO M STEP 1
7070 PRINT L(I,1);L(I,2),
7080 NEXT I
7090 PRINT
7100 GOTO 1000


8000 REM **** ENDE ****      #1010
8010 FOR I=1 TO 10 STEP 1
8020 PRINT
8030 NEXT I
8040 LET I$="        AUSDRUCK FERTIG"
8050 LET Z$="******* BITTE ABSCHALTEN *******"
8060 LET L=3
8070 LET P=3
8080 LET M=3
8090 LET P0=100
8100 LET M0=500
8105 LET M5=20
8110 FOR K=1 TO M0 STEP 1
8120 FOR J=1 TO M STEP 1
```



```
8130 DISP Z$
8140 FOR I=1 TO L STEP 1
8150 NEXT
8160 DELAY 1
8170 NEXT I
8180 DISP I$
8190 FOR I=1 TO P STEP 1
8200 DELAY 1
8210 NEXT I
8220 NEXT J
8230 FOR I=1 TO P0*LOG(K)/(LOG(K)+LOG(M5)) STEP 1
8240 DELAY 1
8250 NEXT I
8260 NEXT K
9000 END
```

***** ENDE PROGRAMM PLIST ******

```
5 ifsp then30
10 cc$="zeichensatz-koordinaten"
20 sx=39:zl=24:sb=0:ad=4:cr$=chr$(13):dc=255:dim c$(dc):tz=42:tz$="*":n8=-1
21 bb=32768:ml=158:kb=623:cz=216:cs=198:ta=59468:tm=14
25 cl$="":fori=1tosx:cl$=cl$+" ":next
26 ll$="▒":fori=1tosx:ll$=ll$+"▒":next
29 poke ta,tm
30 print"▒schreiben......▒1▒","zeichnen.......▒2"
31 print"▒▒▒     oder zeichensatz erstellen"
32 print"                                    ▒"
35 print"▒neue Daten.....▒3▒","bearbeiten.....▒5"
40 print"▒laden..........▒4▒","abspeichern....▒6"
45 ifn8<0""thenprint"▒▒▒":ll$:print#s,n$;"":pokecz,11:print"▒"
50 pokenk,0:ifn8<0thenprint"▒▒>  ";:open1,0:input#1,i1$:close1:print:goto75
60 print"▒oder ausdruck von..bis  0 ,"n8:print"▒"tab(22);
70 input i1$,i2:i1=val(i1$):i1$=left$(i1$,1)
75 ifi1$="s"then#$="plot-text":goto80
76 ifi1$="z"then#$="plot-diagram":goto80
79 goto100
80 rem load
81 print"▒▒":fori=1to4:printcl$:next:print"▒▒▒▒":ifn8<0then85
82 print"hast du auch alles abgespeichert? ▒1▒▒3▒ ";
83 open1,0:pokenk,0:input#1,i$:close1:ifi$<>"j"then30
85 print"▒▒":cl$:print,"▒▒▒und weiter geht's"
86 p$="▒load"+chr$(34)+"0:"+p$+chr$(34)+",8"+cr$
87 ifi1$="s"then#=#+"▒run  ▒#### bitte text eingeben! ####▒▒▒":goto99
88 p$=p$+"▒boot0▒▒"+chr$(141)
89 p$=p$+"▒▒                                    ▒▒"
90 p$=p$+"▒▒          bitte bei Bedarf          ▒▒"
91 p$=p$+"▒▒ Funktion in Zeile 1..48 definieren ▒▒"
92 p$=p$+"▒▒                                    ▒▒"
93 p$=p$+chr$(141)+" 1 y="
99 fori=1tolen(p$):pokekb+i-1,asc(mid$(p$,i)):next:pokenk,len(p$):end
100 ifi1$="n"thensub280:goto30
105 ifi1$="b"thensub300:goto30
110 ifi1$="l"thensub1000:goto30
115 ifi1$="a"thensub1260:goto30
120 ifi1=0thenifi1$<>"0"then30
130 ifi1>i2ori1<0ori2>n8then#$="bereich"+str$(i1)+" -"+str$(i2)+" unzulaessig!":goto30
132 input"▒▒▒ausgabe ▒1▒drucker / ▒2▒ildschirm  ▒▒▒▒";i$:ifi$="d"thensa=ad:goto135
133 ifi$="b"thensa=ab:f%=-1:goto140
134 print"▒▒":goto132
135 input"▒▒druck einzelnen bestaetigung  ▒1▒ ▒2▒  ▒ ▒▒▒▒";i$
136 f%=0:ifi$="j"thenf%=-1:goto140
137 ifi$<>"n"thenprint"▒▒▒":goto135
140 print"▒▒":open#a,sa:print#a,"▒datei ▒"cs$"▒":print#a:print#a:closea
142 forj=1toi2:n7=j:gosub450:open#a,sa:print#a:closea
143 ifj=i2thenifsa=abthenprint"▒letzter code!▒":pokenk,0
145 print"weiter -> ▒return▒"
150 getz$:ifz$<>cr$andf%then150
160 printcl$"▒" ne t:goto30
280 rem *** neue daten eingeben ******
290 cs$="":n8=-1:input"▒▒▒groesse punktmatrix   ▒ ▒▒▒▒";za
295 ifza<1then290
300 rem *** bearbeiten ****************
305 ifza<1then280
306 i$="▒punktmatrix ▒"+mid$(str$(za),2):printi$:fori=1tolen(i$)-2:print"-":next
310 print"▒▒▒zeichencode nr.? bearbeiten," input"oder ▒ident-  +▒▒▒▒";i$
311 ifi$="f"thenreturn
312 n7=val(i$):ifn7=0thenifi$<>"0"thenprint"":goto300
315 ifn7>n8thenfori=n8+1ton7:c$(i)="":next:n8=n7
320 print"▒▒▒bearbeiten: ▒anzahl koordinaten aendern."
325 input"oder kopieren von code nr=  b▒▒▒▒";i$
330 ifi$="b"then375
335 ifi$="a"then400
340 i=val(i$):ifi=0thenifi$<>"0"then300
345 print:i1=n7:n7=i:sa=sb:gosub450:i=n7:n7=i1
346 printi1$:print"code nr."n7"mit inhalt von";
350 pokenk,0:input"ueberschreiben  ▒1▒ ▒2▒  ▒ ▒▒▒▒",i$:ifi$="n"then300
351 ifi$<>"j"thenprint"▒▒":goto350
355 print"▒kopiere platz nr. von..bis  1 ,"1
360 print"▒"tab(22);:input:i1,i2
365 ifi2-i1<0ori1<1ori2>1thenprint"▒unzulaessiger bereich!▒▒▒":goto345
370 c$(n7)=mid$(c$(i),i1,i2-i1+1)
375 printcl$"▒ont▒" fori=kb+3*(sp+1)+4+len(c$(n7))tobb+zl*(sp+1)+sstep4:pokei,tz:
380 next:sa=sb:gosub450
385 p$="▒"+tz$+"   "+tz$+" ▒▒▒▒"
390 fori=1tolen(p$):pokekb+i-1,asc(mid$(p$,i)):next:pokenk,len(p$)
395 pokecz,zl-2:print"▒" end:gosub500:ifi<0then385
396 print"▒":sa=sb:gosub450:print" "i1$:goto310
400 i=len(c$(n7)):input"▒vor platz nr.? wieviel",i1,i2
405 ifi1<1ori1>iori2<1ori2>i1>256ori1-1+i2<0thenprint"▒unzulaessiger bereich!":goto320
410 ifi2<0then425
415 c1$=left$(c$(n7),i1-1):fori=1toi2:c1$=c1$+chr$(0):next
420 c$(n7)=c1$+mid$(c$(n7),i1):goto375
425 c1$=left$(c$(n7),i1-1+i2):c$(n7)=c1$+mid$(c$(n7),i1):goto375
450 rem *** ausdruck ****************
455 closesa:open#a,sa
460 printsa,"▒"right$("  "+str$(n7),4)"▒ " l=len(c$(n7)):ifl=0then480
470 fori=1tolste20:forii=0to19:ifii+i>lthenii=19:next:goto475
471 printsa,right$("  "+str$(asc(mid$(c$(n7),i+ii))),4);:next:ifsa=adthenprint#sa
475 next
480 print#a:closesa:return
500 rem *** vom bildschirm lesen *****
510 c$(n7)="":forj=bb+3*(sp+1)tobb+(zl+1)*(sp+1)-4step4
520 ifpeek(j)=tzthenj=1e38:next:i=0:return
530 p1=0:p0=0:c$="":fori=0to3:p=peek(j+i):c$=c$+chr$(p)
540 ii=0:ifp>47thenifp<58thenii=1
550 ifii=0thenifp<32thenii=3:j=1e38:next:next:i=-1:return
555 ifp0thenifii=1thenii=3:j=1e38:next:next:i=-1:return
560 ifiithenii=1
570 ifp1thenifii=0thenp0=1
580 next:i=val(c$):ifi>255orp1=0thenj=1e38:next:i=-1:return
590 c$(n7)=c$(n7)+chr$(i):next:return
1000 rem *** zeichensatz lesen *******
1010 i$=cs$:ifcs$=""thenifs="▒ ▒"
1015 print"▒▒▒dateiname:  "i$:print"▒"tab(10);:cl$=cs$:inputcs$
1016 iflen(cs$)=0then1015
1020 open15,6,15:open2,8,2,"0:"+cs$+",s,r":input#15,i,i$,i1,i2:ifi=0then1040
1030 gosub1450:goto1250
1040 input#2,i$:ifi$<>cs$thensub1410:goto1250
1050 input#2,i$:print"▒datei kann entweder ganz "
1051 print"oder nur teilweise uebernommen werden!":ifn8<0then1060
1052 ifcl$=""thenprint"bisherigen";
1055 print"  ▒"cl$"▒ wird dabei geloescht":print" bzw. teilweise ueberschreiben
"
1060 printi1$:print"    lese von/bis, schreibe ab code nr."
1061 printor ▒▒ganz "0","n","0 ":print"▒"tab(9);
1070 input#1,i2,i7:i1=val(i1$):i1$=left$(i1$,1):printcl$"▒"
1080 ifi1$="j"thenii=0:i2=n:i7=0:n8=n:zs=z:cl$=cs$:goto1180
1090 ifi1=0thenii=1:i1<>"0"thenprint"▒unkorrekte eingabe!▒▒":goto1061
1100 ifi1<>1thenifi1>0thenifi2<=nthen1115
1110 n$="bereich"+str$(i1)+" bis"+str$(i2)+" unzulaessig!":goto1250
1115 ifi7<0then$="negative code nr. unzulaessig!":goto1250
1120 i8=i7+i2-i1:ifi8>dcthen$="datei wuerde mit"+str$(i8)+" codes zu gross!":goto1250
```

```
1130 if n0(0thenzz=z c1$=cz$
1140 if z<0zathen1160
1150 if10n8thenn8=13
1155 goto1180
1160 i$="ähler" if c1$<>""then1$=c1$
1161 m$="wurktmatrizen  ";"+i$+"ä"+mid$(str$(zz),2)+", "+cs$+"ä"
1170 m$=m$+mid$(str$(z),2)+"!" goto1250
1180 print"Datei: "cs$" wird gelesen",
1190 for j=0to12 c1$="" input#2,l if l=0then1210
1200 for i=1to l get#2,c$ c2$=c2$+left$(c$+chr$(0),1) next
1210 if j>=11then c$(17+j-11)=c2$
1220 next input#15,l,i$,l3,l4
1221 if l3then1=13 l2=l4 print"" gosub1450 m$="wontuns  daten evtl. schon da?!"
     goto1250
1225 if i1$="s"thenm$="ä"+cs$+" hat"+str$(n8+1)+" codes" goto1250
1230 m$="ä"+cs$+" codes von"+str$(i1)+" bis"+str$(12)
1240 m$=m$+" auf"+str$(17)+" bis"+str$(18)
1250 cs$=c1$ close2 close15 return
1260 rem *** zeichensatz abspeichern *
1270 open15,8,15
1280 i$=cs$ if cs$="then i$="ä "
1285 print"Dateiname fuer zeichensatz  "i$ print"N"tab(26), c1$=cs$ input cs$
1290 if len(cs$)=0then1285
1290 gosub1360 if thenc$=c1$ close2 close15 return
1300 print"Daten "cs$" wird abgespeichert" open2,8,2,"@0 "+cs$+",s,w"
1310 print#2,cc$cr$n8,cr$zz,cr$,
1320 for i=0ton8 l=len(c$(i)) print#2,l,cr$, if l>0thenprint#2,c$(i),
1330 next close2 input#15,i,i$,l1,l2
1340 if i=0thenm$="daten unter "+cs$+" abgespeichert" close15 return
1350 gosub1400 goto1280
1360 rem *** dateipruefung ************
1370 open2,8,2,"0:"+cs$+",s,r" input#15,l,i$,l1,l2 if l=62then1=0 close2 return
1380 if l=64thenprint"Daten "cs$" ist eine Programmdatei!" gosub1470 close2 retur
     n
1390 if l=0then1410
1400 gosub1450 close2 return
1410 input#2,l$ if l$<>cc$thenprint"Daten "cs$" ist keine zeichensatz-datei!" gosu
     b1470 close2 return
1420 print"Datei: "cs$" existiert bereits!"
1430 pokenk,8 input"ueberschreiben  ä/ä ä3  ä ä000";l$ if l$="n"thengosub1470
     goto1440
1431 if l$<>"j"thenprint"Nein" goto1430
1440 close2 return
1450 rem *** floppy-fehler ************
1460 print"Floppy-fehler!","spur","sektor" print l,i$tab(20)l1,l2
1470 print"Evtl. neue diskette  -> lw 0 einlegen,"
1480 print,,"ä return druecken!"
1490 get l$ if l$<>cr$then1490
1500 print#15,"i0" input#15,l,i$,l1,l2 if l=1then1460
1510 i=l:i$="" return
9000 rem **** verkuerztes lesen vom bildschirm  ohne weitergehende pruefung
9010 rem **** numerische zuweisung durch val($)
9020 rem **** falsche zeichen nur bei wert 0 gewertet
9500 rem *** vom bildschirm lesen ****
9510 c$(n7)="" for j=bb+34(sp+1)tobb+(z1+1)*(sp+1)-4step4
9520 if peek(j)=tzthen1=0 j=1e38 next return
9530 c$="" for i=0to3 c1=c1+chr$(peek(j+i)) next i=val(c$)
9540 if i>255thenj=1e38 i=-1 next return
9550 if i>0then9590
9560 e0=0 for i=0to3 w=peek(j+i) if w=48thenw=w0+1 goto9580
9570 if w<32thenl=-1 i=0 j=1e38 next next return
9580 next if w0<0thenl=-1 j=1e38 next next return
9590 c$(n7)=c$(n7)+chr$(i) next return
```



```
 0 gosub(sp)+1goto50,169
49 return
50 print"Daten allerseits!" printtab(11)"Zeichen geht's los"
51 rem "zeichensatz koordinaten"
52 sx=39 z1=24 cr$=chr$(13) l$=chr$(148) bs$="N" s$="ä000WN"
53 ms$="w1-d.wmata" wx=.1 xs=800 ys=2000 xmax=1.5 z1=0 z1=2 sp=5
54 mw=10 dc=128 xf=.6 xh=.75 dx=1e-6 px=30 xl=5 dx=2 xw=0 lw=lox(10)
55 bb=32768 n8=15:n10=n8:n2=n8 n3=n8 cs=198 ts=94:z=2 tm=14 nr=12
56 print"Setzt zur ausgabe" print"NNNNNNNNNN"
59 dim c$(dc) dim(mw-1) dim(mw-1) dim(mw-1,2) dim(mw-1,2)
60 w$=wd+str$(0) open1,8,15,"i0 "+ms$+"0" close1
61 def fn ln(x)=log(x)/l
62 def fn ln0(x)=int(val(str$(fn ln(abs(x))))+1
64 goto100
65 i%=len(i$)+1 i1%=0 for x=2tolen(i$) i0$=mid$(i$,x,1) if i0$="."then1%=x
66 if i0$="e"then1%=x x=len(i$) if i%>i1%then1%=i%
67 next i0$="" if i1%then i0$=mid$(i$,i1%) i$=left$(i$,i1%-1)
68 i$=left$(i$,i%-1)+mid$(i$,i%+1)
69 w=2:for x=2tolen(i$):if mid$(i$,x,1)<>"0"then w=x x=len(i$)
70 next if w>=2 len(i$)then.74
71 i$=left$(i$,w-1)+mid$(str$(int(val(mid$(i$,w,m+1)))/10+.5)),2)
72 if len(i$)=w+nthen1%=i%+1
73 if len(i$)>i%-1thenfor x=len(i$)+1toi%-1 i$=i$+"0" next
74 if len(i$)>i%-1thenx=i%-1 for x=len(i$)toi%step-1 if asc(mid$(i$,x))>48thenw=x
   x=0
75 if len(i$)>i%-1thennext i$=left$(i$,w)
76 if len(i$)=i%-1then1%=0
77 i$=i$+mid$(i$,i%-1,2)+"."+mid$(i$,i%)
78 if left$(i$,1)="-"then i$=mid$(i$,2) if i%then1%=i%-1
79 i$=i$+i0$ return
80 i%=wi/mw i=wi-i%*mw if i%=wi%then return
82 open15,8,15:open2,8,2,"@0:"+ws$+",s,w":for k=0tomw-1 print#2,x(k)cr$y(k)cr$,
83 for l=1to2 print#2,sx(k,l)cr$sy(k,l)cr$, next next close2
85 wi%=i% ws=ws$+str$(i%) open2,8,2,"0 "+ws$+" s,r" input#15,k
86 if k=0thenfor k=0tomw-1 x(k)=0 y(k)=0 for l=1to2 sx(k,l)=0 sy(k,l)=0 next next go
   to89
87 for k=0tomw-1:input#2,x(k),y(k) for l=1to2 input#2,sx(k,l),sy(k,l):next next
89 close2 close15 return
100 l1$="" for i=1tos print l1$, l1$=l1$+"" next
101 c1$="" for i=1tos print i$, c1$=c1$+" " next
110 rem ** steuercodes
111 data134,138
112 read ra, rb
113 rem fan tau
114 ww=255  rem move
130 rem ** voreinstellungen
140 data 2600,2800, 7,10, 0,10, 3,  1,  1, 1, 1,  1,  1,10,10,  1,-1
145 read  xo,  yo, zx,zy,zw,sw,rd,,xl,,xf,rx,sx,,sy,,ry,,xw,,n8
150 data "asc","Kontrolle","Kontrolle","ä "
155 read  cs$,        c$,        c$, ms$
160 wz=zw/180*† wz=zw/180*†
169 print#15"N" close2 close15
170 rem *** zeichensatz lesen
172 if c$= "" goto170 print"Daten"tab(12)"ä Zeichensatz " print"Dateiname  "i$
    printtab(3)"N",
180 input i$ gosub1000 if i$="" then printc$("Daten ä ä ä ä ä ä ä ä ä ä ä ä ä ä ä ä", goto150
181 w=0 for i=1tolen(c$/4)step2 w=w+asc(mid$(c$,i,1)) next w=w-(i-1)*24
    ä+
190 rem *** achsenbeschriftung
200 .$$", achse" y$=" achse" l1=len(y$)
210 goto1.tu print"N"tab(l+1)" achsenbeschriftung  ä0"
220 print"Achtung  nur 'return' -> keine Achse,"
230 print"  kurz eingabe  -  kein l.e. t."
250 print"ä" l1$="ä" print"Text auf "+y$ printtab(l1+9)"N"; input"  ä :000", x,
260 print"ä     auf "+y$ printtab(l1+5)"N", input"  ä :000", y$
```

```
270 print"▒"l1$"▒":print"Groesse der Schriftzeichen in mm:"
280 print"────────────────────────────"
290 print"Breite, Hoehe=  "zb"▒,"zh:printtab(14)"▒";
300 pokenk,1:pokekb,29:inputi1$,i2$:ifleft$(i1$,1)=bs$then170
305 zb=val(i1$):zh=val(i2$):b=zb*sf:h=zh*sf
310 print"▒kursivwinkel in grd=  "sw:print"────────────▒"tab(20);
320 pokenk,1:pokekb,29:inputi$:ifleft$(i$,1)=bs$then190
321 sw=val(i$):ws=sw/180*↑
322 print"▒▒stiftbewegung ▒s▒chnell/▒l▒angsam  s"
323 input"────────────                    ▒";i$:vf%=2:ifi$="l"thenvf%=1
324 ifi$="ll"thenvf%=0
325 ifleft$(i$,1)=bs$then190
328 print"▒▒───────────────▒▒"cr$"Staerke Fettdruck "fd"▒▒▒▒";:inputfd
330 rem *** optionen
340 poketg,tm:print"▒"tab(10)"▒ Optionen fuer Achsen ▒▒"
350 i$=x$+" ":i%=xx%:c$=cx$:gosub370:ifleft$(i$,1)=bs$then190
351 xx%=i%:nx%=i1%:ifi%=3thencx$=i$
360 i$="▒▒▒"+y$+" ":i%=yy%:c$=cy$:gosub370:ifleft$(i$,1)=bs$then330
361 i$(0)="▒eturn▒    Fehler  ▒"+bs$:i$(1)="return    Fehler  "+bs$
362 print"weiter ->▒":i%(0)=18:i%(1)=18:s=10:z=peek(cz):i1$=i$:gosub12000:ifi$=
    bs$then330
363 ifi$<>cr$then362
365 yy%=i%:ny%=i1%:ifi%=3thency$=i1$
366 goto430
370 printi$tab(l1+2)"linear.....................▒1▒":i%(1)=peek(cz)+600
380 printtab(l1+2)"▒logarithmisch...............▒2▒":i%(2)=peek(cz)+1300
390 printtab(l1+2)"▒logar. incl. Wert Null.......▒3▒":i%(3)=peek(cz)+2200
391 print"▒"l1$"▒"
400 printcl$"▒":printtab(l1+2)"nr= "i%"▒    ▒▒▒":printtab(l1+5)"▒";
410 inputi$:ifi$=bs$thenreturn
411 i1%=i%:i%=val(i$):ifi%<1ori%>3thenprint"▒▒":i%=i1%:goto400
412 print"▒"cl$"▒":i1=(i%(i%)-1)/100:z=int(100*(i1-int(i1))+.5)
414 i2=bb+z*(sp+1)+l1+2.5:fori=i2toi2+int(i1)-1:pokei,peek(i)+128:next:ifi%=1th
    enreturn
416 z0=peek(cz):input"Zahlen ▒e▒xponential / auch ▒n▒ormal  n▒▒▒";i$
417 ifi$="e"theni1%=0:pokecz,z:print"▒":print"▒exp":goto422
418 ifi$="n"theni1%=-1:pokecz,z:print"▒":print"▒norm":goto422
419 ifi$=bs$thenreturn
420 pokecz,z-1:print"▒":oni%goto370,380,390
422 pokecz,z0:print"▒":printcl$"▒":ifi%<3thenreturn
424 print"'Wert Null' bedeutet  ",:s=peek(cs):printc$"▒":printtab(s-2),
425 inputi$:return
430 rem *** formate
440 poketg,tm:print"▒"tab(12)"▒  Formate  ▒▒▒"
450 i$="Zeichenformat ":fori=2tolen(i$):print"‾";:next:print"▒▒"
460 printi$x$"  mm= "x8*xa"▒    ":printtab(l1+len(i$)+5)"▒";
470 inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then330
471 x8=val(i1$)/xa:ifx8>x9thenx8=x9:print"▒▒":goto460
472 ifx8=0thenprint"▒▒":goto460
480 print"▒"tab(len(i$))y$"  mm= "y8*ya"▒    ":printtab(l1+len(i$)+5)"▒";
490 inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then430
491 y8=val(i1$)/ya:ify8>y9theny8=y9:print"▒▒▒":goto480
492 ify8=0thenprint"▒▒▒":goto480
500 print"▒"l1$"▒▒▒":i$=x$:fori=1tolen(i$):print"‾";:next:print"▒▒"
510 printi$"  von,bis=  ",:s=peek(cs)-2:z=peek(cz):printx1"▒,"x2
520 pokecz,z:print"▒":pokecs,s:pokenk,1:pokekb,29:inputi1$,i2$:ifleft$(i1$,1)=b
    s$then430
521 i1=x1:i2=x2:x1=val(i1$):x2=val(i2$)
530 ifx1=0andi1$<>"0"orx2=0andi2$<>"0"orx1=x2thenx1=i1:x2=i2:goto520
531 ifxx%>1thenifx1=0orx2=0thenx1=i1:x2=i2:goto520
535 print"▒":i$=y$:fori=1tolen(i$):print"‾",:next:print"▒▒"
540 printi$"  von,bis=  ",:s=peek(cs)-2:z=peek(cz):printy1"▒,"y2
550 pokecz,z:print"▒":pokecs,s:pokenk,1:pokekb,29:inputi1$,i2$:ifleft$(i1$,1)=b
    s$then430
551 i1=y1:i2=y2:y1=val(i1$):y2=val(i2$)
560 ify1=0andi1$<>"0"ory2=0andi2$<>"0"ory1=y2theny1=i1:y2=i2:goto550
```



```
561 ifyy%>1thenify1=0ory2=0theny1=i1:y2=i2:goto550
570 print"▒"l1$"▒▒▒":i$="Skalierungsfaktor  ":fori=2tolen(i$):print"‾",:next
580 print"▒▒":printi$"▒▒":ifxx%<>1thenfx=1:goto620
590 ifx$=""then620
600 print"▒"tab(len(i$))x$"= ",:l=peek(cs)-1:printfx:printtab(l)"▒",
610 inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then430
611 i=fx:fx=val(i1$):iffx>0thenif(fnlg(fx)-int(fnlg(fx))<fx*dithen620
612 print"▒▒▒":fx=i:goto600
620 ifyy%<>1thenfy=1:goto660
630 ifyy$=""then660
640 print"▒"tab(len(i$))y$"= ",:l=peek(cs)-1:printfy:printtab(l)"▒",
650 inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then430
651 i=fy:fy=val(i1$):iffy>0theniffnlg(fy)-int(fnlg(fy))<fy*dithen660
652 print"▒▒▒":fy=i:goto640
660 print"▒":i$="Raster ":fori=2tolen(i$):print"‾",:next
670 print"▒▒":printi$"▒▒":ifxx%<>1orxx$=""then700
680 print"▒"tab(len(i$))x$"= ",:l=peek(cs)-1:printrx:printtab(l)"▒";
690 inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then430
691 i=rx:rx=val(i1$):ifrx<=0thenprint"▒▒▒":rx=i:goto680
700 ifyy%<>1oryy$=""then730
710 print"▒"tab(len(i$))y$"= ",:l=peek(cs)-1:printry:printtab(l)"▒",
720 inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then430
721 i=ry:ry=val(i1$):ifry<=0thenprint"▒▒▒":ry=i:goto710
730 rem *** lage koordinatenkreuz
732 poketg,tm:print"▒"tab(8)"▒ Koordinatenkreuz ▒▒"
734 ifxx$=""then746
736 print"▒":fori=1tolen(x$):print"‾",:next:print"▒▒"
738 printx$" durch y=  ";:s=peek(cs)-2:z=peek(cz):printy1,yy$
740 pokecz,z:print"▒":pokecs,s:pokenk,1:pokekb,29:inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$th
    en430
742 j=la:la=val(i1$):ifla=0thenifleft$(i1$,1)<>"0"thenla=j:goto740
744 i=sgn(y2-y1):ifi*la<i*y1ori*la>i*y2thenla=j:goto740
746 ifyy$=""then758
748 print"▒":fori=1tolen(y$):print"‾",:next:print"▒▒"
750 printy$" durch x=  ";:s=peek(cs)-2:z=peek(cz):printx1;xx$
752 pokecz,z:print"▒":pokecs,s:pokenk,1:pokekb,29:inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$th
    en730
754 j=lo:lo=val(i1$):iflo=0thenifleft$(i1$,1)<>"0"thenlo=j:goto752
756 i=sgn(x2-x1):ifi*lo<i*x1ori*lo>i*x2thenlo=j:goto752
758 ifxx$=""oryy$=""then780
760 print"▒"l1$"▒▒":i$="Abstand ":fori=2tolen(i$):print"‾";:next
762 print"▒▒":printi$"▒▒"
764 iflo<>x1thenda=0:goto772
766 print"▒"tab(len(i$))x$" von "y$"  mm= ",:l=peek(cs)-1:printda:printtab(l)"▒
    ",
768 inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then730
770 i=da:da=val(i1$):ifda<0thenprint"▒▒▒":da=i:goto766
772 ifla<>y1thendo=0:goto780
774 print"▒"tab(len(i$))y$" von "x$": mm= ";:l=peek(cs)-1:printdo:printtab(l)"▒
    ",
776 inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then730
778 i=do:do=val(i1$):ifdo<0thenprint"▒▒▒":do=i:goto766
779 print"▒"l1$
780 print"▒▒":i$="Randstreifen aendern  ":fori=3tolen(i$):print"‾",:next
782 print"▒▒":printi$"▒▒"
784 print"▒"tab(len(i$))"links  ",:s=peek(cs)-2:printa5"mm▒":printtab(s),
786 pokenk,1:pokekb,29:inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then730
788 i=a5:a5=val(i1$):ifa5=0thenifleft$(i1$,1)<>"0"thenprint"▒▒▒":a5=i:goto784
790 print"▒"tab(len(i$))"rechts  ";:s=peek(cs)-2:printa6"mm▒":printtab(s);
792 pokenk,1:pokekb,29:inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then730
794 i=a6:a6=val(i1$):ifa6=0thenifleft$(i1$,1)<>"0"thenprint"▒▒▒":a6=i:goto790
796 print"▒"tab(len(i$))"unten  ",:s=peek(cs)-2:printo5"mm▒":printtab(s),
798 pokenk,1:pokekb,29:inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then730
800 i=o5:o5=val(i1$):ifo5=0thenifleft$(i1$,1)<>"0"thenprint"▒▒▒":o5=i:goto796
802 print"▒"tab(len(i$))"oben  ",:s=peek(cs)-2:printo6"mm▒":printtab(s),
804 pokenk,1:pokekb,29:inputi1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then730
```

```
i=o6:o6=val(i1$):ifo6=0then1:left$(i1$,1)<>"0"thenprint"■■■":o6=i:goto802
rem *** skalierungsparameter
pokeb,yr:print"■■■ ■ skalierungsparameter werden berechnet "
printtab(12)"■■■ruhe, ich denke!"
s=18:printtab(s)"■■■■ ???■"cr$tab(s)" ■■"cr$tab(s)" JFKP"cr$tab(s)"■U4IN"
printtab(s)"]]S]"cr$tab(s)"■J■K"cr$tab(s)" ■ L"cr$l1$
b2=.3*zb:h2=.8*zh:b3=.5*zb:h3=.5*zh
t1=.2*(b2+h2)/pa:t2=t1/3:t3=5
r=abs(x1/fx):i0=1:i2=abs(x2/fx):ifi2>1then1=i2
ifi2<10then10=i2
ifi=0then1=1
ifi0=0then10=1
j=abs(y1/fy):j0=1:i2=abs(y2/fy):ifi2>1thenj=i2
ifi2<10thenj0=i2
ifj=0thenj=1
ifj0=0thenj0=1
i=fnuk(i):i0=fnuk(i0):j=fnuk(j):j0=fnuk(j0)
ii=s1*b2:ifi0<(-lor)>sthenii=(s1+3)*b2+3*b2*ef
ifyy%>1thenii=2*b2+3*b2*ef
i2=s1*b2/2:ifi0<-lor)>sthenii2=((s1+3)*b2+3*b2*ef)/2
ifxx%>1thenii=(2*b2+3*b2*ef)/2
ifi2>1thenii=i2
a1=(1.2*zh+i)/pa+1.5*t1:a2=i2/pa:a4=da/pa:cx=(2*b2+3*b2*ef+h3/2)/pa/2
ifxx%=3thenifsgn(x2-x1)>0thena4=a4+h3/pa+cx
ifxx%=3thenifsgn(x2-x1)<0thena2=a2+h3/pa+cx
iffx<>1thena2=a2+6*b2/pa:iffx<>10thena2=a2+3*b2*ef/pa
o1=1.2*(zh+h2)/pa+1.5*t1:ifyy%>1orj>sathenol=o1+.5*h2*ef/pa
o2=(h2*ef*(1-eh)+h2/2)/pa:o4=do/pa:cy=(h2*ef+h2+h3/2)/pa/2
ifyy%=3thenifsgn(y2-y1)>0theno4=o4+h3/pa+cy
ifyy%=3thenifsgn(y2-y1)<0theno2=o2+h3/pa+cy
iffy<>1theno2=o2+(1+ef)*h2/pa
a1=a1+a4+a5/pa:o1=o1+o4+o5/pa:a2=a2+s6/pa:o2=o2+o6/pa
x3=x1:x4=x2:ol=lo:ifx%>1thenx3=fnls(x1):x4=fnls(x2):ol=fnls(lo)
y3=y1:y4=y2:al=la:ifyy%>1theny3=fnls(y1):y4=fnls(y2):al=fnls(la)
xk=(a1*x4+x3*(a2-a8))/(a1+a2-a8):xg=(x3*x4-a2*xk)/(x3-a2)
yk=(o1*y4+y3*(o2-y8))/(o1+o2-y8):yg=(y3*y4-o2*yk)/(y3-o2):my=y8/(yg-yk)
mx%=sgn(mx):my%=sgn(my)
rem teilstrichabstand zur achsenmarkierung
xr=1:ifxx%=1thenifxx$<>""thenr2=abs(x1-x2):r=rx:gosub1020:xr=r2
yr=1:ifyy%=1thenifyy$<>""thenr2=abs(y1-y2):r=ry:gosub1020:yr=r2
goto1030
i$=str$(r2):n=si:gosub65:r2=val(i$)/r:return
rem posit.contr
x=x3:ifmx%<0thenx=x4
y=y3:ifmy%<0theny=y4
ifxx%=3thenx(0)=100*(x-cx/mx):sx(0,1)=0:sx(0,2)=0
ifyy%=3theny(0)=100*(y-cy/my):sy(0,1)=0:cy(0,2)=0
rem *** messwerte
pokeb,tw:print"■"tab(12)"■ Wertepaare ■■"
print"wenn Punkte einzeichnen, dann bitte■■■:print"einsaeben!",
ifxx%=3thenprint"■, "cx$" nicht einsaerechnet!";
ifyy%=3thenprint"■, "cy$" nicht einsaerechnet!";
print"■■■■":pokenk,0
print"■■Anzahl Messpunkte= ";:i$=week(cs)-1:printnm"■                    ■" printta
b(s),:input:i$
ifleft$(i$,1)=bs$thenifxx$=""thenifyy$=""then430
ifleft$(i$,1)=bs$then750
i=nm:nm=val(i$):ifnm=0andi$<>"0"thenprint"■■■":goto1046
ifnm<1thennm%=3:print"■■■■"cl$"■■■"cr$ll$cr$"■■■":goto1062
print"■■■■"cl$"■■■"cr$ll$cr$"■■■■■ewuenschtes Symbol  ";i$=week(cs)-2:printm
i$"■"
i$=nm$:printtab(s);:input:nm$:ifnm$=""thennm$=i$:goto1051
print"■"ll$"■" s=7
printtab(s)"■hur Punkte einzeichnen.....■1■":i%(1)=week(cz)+2200
printtab(s)"■Punkte durch Geraden verbinden.■2■":i%(2)=week(cz)+3000
printtab(s)"■Funktion einzeichnen.........■3■":i%(3)=week(cz)+2000:print
"■"ll$"■"
```



```
printcl$"■" printtab(s)"nr= "nm$"■|    ■■■■" printtab(s+3)"■";
input:i$ ifi$=bs$then1040
i1%=nm% nm%=val(i$):ifnm%<1ornm%>3thenprint"■■" nm%=i1%:goto1057
print"■"cl$"■" i1=(i1%(nm%)-1)/100:z=int(100*(i1-int(i1))+.5)
i2=bb+z*(sp+1)+s+.5:fori=i2toi2+int(i1)-1:pokei,week(i)+128:next
ifnm%=3thenprinttab(14)"■bereits in 1..40 stehen!"
i$(0)="■weiter ->  ■return■    Fehler  ■"+bs$
i$(1)="■weiter ->    return    Fehler  "+bs$
ifnm%=3then1$(0)="■Funktion ■muss"+cr$+i$(0):i$(1)="■Funktion ■muss"+cr$+i$
(1)
i%(0)=18:i%(1)=18:s=0:z=week(cz):gosub12000:ifi$=bs$then1040
ifi$<>cr$then1066
rem *** streuung
ifnm<1then1360
print"■"tab(13)"■ Streuung ■■"
print:i$="":i%=s%:gosub1084:ifleft$(i$,1)=bs$then1040
s%=i%:i$="■■■"+y$+"  ":i%=s%:gosub1084:ifleft$(i$,1)=bs$then1068
i$(0)="■return■    Fehler  ■"+bs$:i$(1)="return    Fehler  "+bs$
print"weiter ->■":i%(0)=18:i%(1)=18:s=10:z=week(cz):gosub12000:ifi$=bs$the
n1068
ifi$<>cr$then1078
s%=i%:goto1100
printi$tab(11+2)"ohne Streuung.............■1■":i%(1)=week(cz)+1300
printtab(11+2)"mit Streuung (symmetrisch)...■2■":i%(2)=week(cz)+2600
printtab(11+2)"mit Streuung (asymmetrisch)..■3■":i%(3)=week(cz)+2700:prin
t"■"ll$"■"
printcl$"■" printtab(11+2)"nr= "i%"■|    ■■■■":printtab(11+5)"■";
input:i$ ifi$=bs$thenreturn
i1%=i:i%=val(i$):ifi%<1ori%>3thenprint"■■":i%=i1%:goto1090
print"■"cl$"■" i1=(i%(i%)-1)/100:z=int(100*(i1-int(i1))+.5)
i2=bb+z*(sp+1)+11+2.5:fori=i2toi2+int(i1)-1:pokei,week(i)+128:next:return
rem *** eingabe wertepaare
pokeb,tw:print"■                ■ bitte Messwerte eingeben ■■"
d1=abs(x1*d1):d2=abs(x2*d1):d3=abs(y1*d1):d4=abs(y2*d1):forw1=0tonm
gosub80:gosub1240:ifleft$(i$,1)=bs$thenx1=x:x=3andw1=0orxx%<3andw1=1then106
8
ifleft$(i$,2)=bs$+bs$then1100
ifleft$(i$,1)=bs$thenprintcr$ll$cr$ll$:w1=w1-2:gosub80
next:print"■■" i$(0)="■return■    Fehler  ■"+bs$:i$(1)="return    Fehler
"+bs$
print"weiter ->■":i%(0)=18:i%(1)=18:s=10:z=week(cz):gosub12000:ifi$=bs$the
n1100
ifi$<>cr$then1112
rem *** editor
ifnm=0then1040
pokeb,tw:print"■"tab(7)"■ Messwerte korrigieren ■■"
printtab(7)"nochmal durchsehen....■"bs$
print"■einfuegen.........■a■","loeschen.........■l■"
print"■verbessern........■v■","alles in Butter...■b■":printll$
i$(0)="■?" i$(1)="?" i%(0)=18:i%(1)=18:z=week(cz):s=19:gosub12000
ifi$="e"then1136
ifi$="l"then1146
ifi$="v"then1160
ifi$="b"then1360
ifi$=bs$then1040
goto1127
rem einfuegen
input"von platz nr.?, wieviel",i1$,i2$:ifleft$(i1$,1)=bs$then1120
m=val(i1$):n=val(i2$):ifm<0andi2$<>"0"orm=0andi2$<>"0"thenprint"■■":goto11
38
ifn<0ornthenn=nm+1
ifm<1then1120
print"■■":i1=nm-i2:n:i3=-1:gosub1155:forw1=ntonm-1:goto1106
rem loeschen
printcl$"■" input"von, bis",i1$,i2$:ifleft$(i1$,1)=bs$then1120
m=val(i1$):n=val(i2$):ifm<0andi2$<>"0"orm=0andi2$<>"0"thenprint"■■":goto11
48
```

```
1152 ifn>worn<0ora>nwthen1120
1154 m=n-m-1 i1=n-m:i2=nm:i3=1:gosub1155:goto1120
1155 for i0=i1to i2step i3:wi=i0:gosub80
1156 i1=x(i):i2=y(i):i3=sx(i,1):i4=sy(i,1):i5=x(i,2):i6=y(i,2)
1157 x(i)=0:y(i)=0:sx(i,1)=0:sy(i,1)=0:sx(i,2)=0:sy(i,2)=0:wi=i0+m:gosub80
1158 x(i)=i1:y(i)=i2:sx(i,1)=i3:sy(i,1)=i4:sx(i,2)=i5:sy(i,2)=i6:next:nm=nm+m:r
     eturn
1160 rem verbessern
1161 i2$="S"
1162 printc1$"M":input"verbessere Wert nr.";i1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then1120
1164 wi=val(i1$):ifwi=0thenifi1$<>"0"thenprint"MM":goto1162
1166 ifwi<0orwi>nwthenprint"MM":goto1162
1168 print12$"M":i2$="":gosub80:gosub1240:print"M":ifi$=bs$then1120
1170 goto1162
1240 i$="":ifwi=0thenifxx%<3thenifyy%<3thenreturn
1242 ifwi=0thenifxx%=3thenprintcx$;
1244 ifwi=0thenifyy%=3thenprintcy$;
1246 ifwithenprintwi"M"sc$,
1248 print":";:s=peek(cs):z=peek(cz):print
1249 ifwi=0thenifxx%=3then1264
1250 pokecz,z:print"M":printtab(s)xx$"=  ";
1252 s=peek(cs):z=peek(cz):print
1254 pokecz,z:print"M":printtab(s)x(i)"M"cl$
1256 pokecz,z:print"M":printtab(s-2);:pokenk,1:pokekb,29:input i$
1258 ifleft$(i$,1)=bs$thenreturn
1260 i1=x(i):x(i)=val(i$):ifx(i)=0thenifi$<>"0"thenx(i)=i1:goto1254
1262 ifd1<mx%*(x1-x(i))or(x(i)-x2)*mx%>d2thenx(i)=i1:goto1254
1264 ifwi=0thenifyy%=3then1280
1266 pokecz,z:print"M":printtab(s+len(i$)+5)yy$"=  ";
1268 s=peek(cs):z=peek(cz):print
1270 pokecz,z:print"M":printtab(s)y(i)"M"cl$
1272 pokecz,z:print"M":printtab(s-2);:pokenk,1:pokekb,29:input i$
1274 ifleft$(i$,1)=bs$thenreturn
1276 i1=y(i):y(i)=val(i$):ify(i)=0thenifi$<>"0"theny(i)=i1:goto1270
1278 ifd3<my%*(y1-y(i))or(y(i)-y2)*my%>d4theny(i)=i1:goto1270
1280 ifsx%=1thenifsx%=1thenreturn
1282 ifsx%=1orwi=0andxx%=3then1318
1284 print"Streuung "xx$"  "sc$;:ifsx%=3thenprint"Mneg.=  ";
1286 s=peek(cs):z=peek(cz):print
1288 pokecz,z:print"M":printtab(s)sx(i,1)"M"cl$
1290 pokecz,z:print"M":printtab(s-2);:pokenk,1:pokekb,29:input i$
1292 ifleft$(i$,1)=bs$thenreturn
1294 i1=sx(i,1):sx(i,1)=val(i$)
1296 ifsx(i,1)=0thenifi$<>"0"thensx(i,1)=i1:goto1288
1298 ifsx(i,1)<0thensx(i,1)=-sx(i,1):print"MM":goto1288
1300 ifsx%=2thensx(i,2)=sx(i,1):goto1318
1302 pokecz,z:print"M":printtab(s+len(i$)+1)";  pos.=  ";
1304 s=peek(cs):z=peek(cz):print
1306 pokecz,z:print"M":printtab(s)sx(i,2)"M"cl$
1308 pokecz,z:print"M":printtab(s-2);:pokenk,1:pokekb,29:input i$
1310 ifleft$(i$,1)=bs$thenreturn
1312 i1=sx(i,2):sx(i,2)=val(i$)
1314 ifsx(i,2)=0thenifi$<>"0"thensx(i,2)=i1:goto1306
1316 ifsx(i,2)<0thensx(i,2)=-sx(i,2):print"MM":goto1306
1318 ifsy%=1orwi=0andyy%=3then1354
1320 print"Streuung "yy$"  "sc$;:ifsy%=3thenprint"Mneg.=  ";
1322 s=peek(cs):z=peek(cz):print
1324 pokecz,z:print"M":printtab(s)sy(i,1)"M"cl$
1326 pokecz,z:print"M":printtab(s-2);:pokenk,1:pokekb,29:input i$
1328 ifleft$(i$,1)=bs$thenreturn
1330 i1=sy(i,1):sy(i,1)=val(i$)
1332 ifsy(i,1)=0thenifi$<>"0"thensy(i,1)=i1:goto1324
1334 ifsy(i,1)<0thensy(i,1)=-sy(i,1):print"MM":goto1324
1336 ifsy%=2thensy(i,2)=sy(i,1):goto1354
1338 pokecz,z:print"M":printtab(s+len(i$)+1)";  pos.=  ";
1340 s=peek(cs):z=peek(cz):print
1342 pokecz,z:print"M":printtab(s)sy(i,2)"M"cl$
1344 pokecz,z:print"M":printtab(s-2);:pokenk,1:pokekb,29:input i$
1346 ifleft$(i$,1)=bs$thenreturn
1348 i1=sy(i,2):sy(i,2)=val(i$)
1350 ifsy(i,2)=0thenifi$<>"0"thensy(i,2)=i1:goto1342
1352 ifsy(i,2)<0thensy(i,2)=-sy(i,2):print"MM":goto1342
1354 print i1$"S":return
1360 rem *** markierung
1362 pokets,tm:print"M"tab(9)"Markierungslinien MM"
1364 print"M"cl$cl$"MM":print"Abszissenparallele Bild Nr. ";:s=peek(cs)-3:z=
     peek(cz)
1365 ifxp=xk thenxp=0
1366 input"DDD",i1$:ifi1$="n"thenxp=xk:goto1380
1367 ifleft$(i1$,1)=bs$then1120
1368 ifi1$<>"J"thenpokecz,z-1:print"M":goto1364
1370 pokecz,z:print"M":printtab(s-3)"durch y=  ";:s=peek(cs)-2:z1=peek(cz)
1372 printxp,yy$:pokecz,z1:print"M":printtab(s);
1374 pokenk,1:pokekb,29:input i1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then1120
1376 i=xp:xp=val(i1$):ifxp=0thenifleft$(i1$,1)<>"0"thenpokecz,z-1:print"M":xp=i
     :goto1364
1378 if0<my%*(y1-xp)or(xp-y2)*my%>0thenpokecz,z-1:print"M":xp=i:goto1364
1380 xp=xp:ifyy%>1thenifxp>xkthenxp=fnlx(xp)
1382 print"M"cl$cl$"MM":print"Ordinatenparallele Bild Nr. ";:s=peek(cs)-3:z=
     peek(cz)
1383 ifop=xk thenop=0
1384 input"DDD",i1$:ifi1$="n"thenop=xk:goto1398
1385 ifleft$(i1$,1)=bs$then1360
1386 ifi1$<>"J"thenpokecz,z-1:print"M":goto1382
1388 pokecz,z:print"M":printtab(s-3)"durch x=  ";:s=peek(cs)-2:z1=peek(cz)
1390 printop,xx$:pokecz,z1:print"M":printtab(s);
1392 pokenk,1:pokekb,29:input i1$:ifleft$(i1$,1)=bs$then1360
1394 i=op:op=val(i1$):ifop=0thenifleft$(i1$,1)<>"0"thenpokecz,z-1:print"M":op=i
     :goto1382
1396 if0<mx%*(x1-op)or(op-x2)*mx%>0thenpokecz,z-1:print"M":op=i:goto1382
1398 op=op:ifxp>1thenifop>xkthenop=fnlx(op)
1800 rem *** plotter einschalten
1805 pokets,tm:print"MM"tab(11)"Bild auf geht's!  "
1810 print"Stift in die linke untere Ecke setzen."
1815 print"──────────────────────────────"
1820 print"Plotter einschalten und ";:s=peek(cs):z=peek(cz):print"return drueo
     ken"
1825 print"──────────MM"
1830 i$(0)="Breturn":i%(0)=18:i$(1)="return":i%(1)=18:pokenk,0:gosub12000
1835 ifi$=bs$then1360
1840 ifi$<>cr$then1830
1845 rem *** es geht los
1850 s=4:pokets,sr:print"MMMM":printtab(s)"Bl──────────────────────────────"
1855 printtab(s)"Bjetzt wird dein bildchen gemalt!"
1860 printtab(s)"Bl──────────────────────────────MM"
1865 s=28:closesp:openspp,sp
1870 printtab(s)" !!"cr$tab(s)"UCCI"cr$tab(s)"B00H"cr$tab(s)"JFFK"
1890 printtab(s)" ] "cr$tab(s-1)"M_rL_N"cr$tab(s)" NM"cr$tab(s)"~  | "
1910 printtab(s)"~  | "cr$tab(s)" MN"cr$tab(s)" NM"cr$tab(s)"~  | "cr$tab(s);
1935 print"v  LM"cr$tab(s-6)"?"cr$tab(s-7)"U."cr$tab(s-19)"MNMMMMMMNMMJK"
1950 for i=0tosp:print"-";:next
2000 rem *** x-achse
2010 ifxx$=""then3000
2020 zw=0:wz=zw/180*π:sw%=0:i1=(x3-xk)*mx:i2=(x4-xk)*mx:i5=(al-yk)*my-o4
2021 goto2060
2030 print#sp,"M"0,"int(t1)cr$"D"0","0","int(al)","0","int(al)","int(t1)",";
2040 i=int(x8-a2):print#sp,int(al)","0","i","0","i","int(t1)","i","0",";
2050 print#sp,int(x8)","0","int(x8)","int(t1)cr$"H"
2060 lx=i1:ly=i5:xx=i2:yy=i5:gosub10155
2070 rem *** teilstriche
2080 i3=int(x3/xr)*xr:ifmx%<0thenl3=i3+xr
2090 i4=int(x4/xr)*xr:ifmx%>0theni4=i4+xr
```

```
2100 i6=abs(xr*mx) d1=i1*d1 d2=i2*d1 for i=(14-xl)*mx to(13-xk)*mx-i6*distep-16
2110 ifd1<i1-for i=i2*d2then2130
2120 lx=1 ly=15 xw=1 yw=15-t1 gosub10155
2130 ifxw%=1thenfor j=i-16/t3to(i-16+16/t3)-16/t3*d1step-16/t3 j0=j
2140 ifxw%=1thenifd1<i1-for j=i2*d2then2150
2150 ifxw%=1thenfor j=8to2step-1 j0=i-16+fnly(j)*16
2160 ifxw%=1thenifd1<i1-j0for j0=i2*d2then2180
2170 lx=j0 ly=15 xw=j0 yw=15-t2 gosub10155
2180 ifti$=cr$thenj=0 i=0 print#w,"H" next next goto0
2181 ifti$=""thengosub9990
2182 next next
2190 rem ** zahlen
2200 l0=0 i6=mx%*xr d1=abs(x3*d1) d2=abs(x4*d1) for i=13to14+i6*distep-16
2210 ifd1<x%*(x3-i)for(i-x4)*mx%*d2then2360
2220 i3=i/fx ifxx%=1then i3=i0*i3
2230 i1=(i-xk)*mx ifxx%=1then ifabs(i3/xr*fx)<d1then12$="0" i2%=0 i3$="" goto2310
2240 i%=0 j=fnvk(i3) ifxx%=1orn%then ifj<=-1then ifj<=sgthen i%=-1
2250 ifi%then12$=str$(i3):i3$="":n=sl goto2280
2260 j=fnvk(i3)-1:i3$=str$(j):ifj>=0then i3$=mid$(i3$,2)
2270 i2$=str$(i3/i0*i3) n=sl
2280 i$=i2$ gosub65 i2$=i$ i2%=i% ifi3$=""then2310
2290 ifi2$="1"then i2$="10" goto2310
2300 i2$=i2$+"10"
2310 l=((len(i2$)-sgn(i2%))*b2+len(i3$)*b2+ef)/ka/2 xw=i1-1 ifxw<l0+b2/pathen2360
2320 l0=i1+l yw=15-h2/pa-1.5*t1 b=b2*sf h=h2*sf ifi2$=""then2340
2330 i$=i2$ gosub9000 ifi$=cr$then i=i4 next goto0
2340 e=(h2-h2*ef*el)/pa b=b*ef h=h*ef ifi3$=""then2360
2350 yw=yw+e i3=i3$ gosub9000 yw=yw-e
2351 ifi$=cr$then i=i4 next goto0
2360 next
2365 i$=str$(fnvk(fx)-1)ifleft$(i$,1)=" "then i$=mid$(i$,2)
2370 ifi$="0"then2400
2375 i2$=i$ i$=" (*10" b=b2*sf h=h2*sf gosub9000 ifi$=cr$then0
2380 ifi2$<>"1"then yw=yw+e b=b*ef h=h*ef i$=i2$ gosub9000 yw=yw-e ifi$=cr$then0
2385 b=b2*sf h=h2*sf i$=")" gosub9000 ifi$=cr$then0
2400 rem ** kontrolle
2402 ifxw%<3then2410
2404 zw=90 wz=zw/180*↑ sw%=1 b=b3*sf h=h3*sf xw=(fnly(x(0))-xk)*mx+h3/2/pa yw=0
2406 i$=cx$ gosub9000 ifi$=cr$then i=i4 next goto0
2410 rem ** text
2415 zw=0 wz=zw/180*↑ sw%=1
2420 i$=xx$ l=len(i$)*zb/pa
2421 xw=x0-a2-l yw=0 b=zb*sf h=zh*sf gosub9000
2422 ifi$=cr$then i=i4 next goto0
3000 rem *** y-achse
3010 ifyy$=""then4000
3020 zw=0 wz=zw/180*↑ sw%=0 i1=(y3-yk)*my i2=(y4-yk)*my i5=(o1-xk)*mx-a4
3021 goto3060
3030 print#w,"H"int(t1),"0,cr$"D"0","0","0","int(o1)","int(t1)","int(o1)",",
3040 i=abs(y3-o2) print#w,0","int(o1)","0","1","int(t1)","1","0","1",",
3050 print#w,0","int(y3)","int(t1)","int(y3)cr$"H"
3060 l=15 ly=i1 yw=15 yw=i2 gosub10155
3070 rem ** teilstriche
3080 i3=int(y3/yr)*yr ifmy%<0then i3=i3+yr
3090 i4=int(y4/yr)*yr ifmy%<0then i4=i4+yr
3100 i6=abs(yr*my) d1=i1*d1 d2=i2*d1 for i=(14-yk)*my to(13-yk)*my i6*distep-16
3110 ifd1<i1-for i=i2*d2then3130
3120 lx=15 ly=i yw=15-t1 yw=i gosub10155
3130 ifyy%=1thenfor j=i-16/t3to(i-16+16/t3)-16/t3*d1step-16/t3 j0=j
3140 ifyy%=1thenifd1<i1-for j=i2*d2then3160
3150 ifyy%<0thenfor j=8to2step-1 j0=i-16+fnly(j)*16
3160 ifyy%<0thenifd1<i1-j0for j0=i2*d2then3180
3170 lx=15 ly=j0 xw=15-t2 yw=j0 gosub10155
3180 ifti$=cr$thenj=0 i=0 print#w,"H" next next goto0
```



```
3181 ifti$=""thengosub9990
3182 next next
3190 rem ** zahlen
3200 i6=mx%*yr d1=abs(y4*d1) d2=abs(y4*d1) for i=13to14+i6*distep16
3210 ifd1<x%*(y3-i)for(i-y4)*mx%*d2then3360
3220 i3=i/fy ifyy%<0then i3=i0*i3
3230 i1=(i-yk)*my ifyy%=1then i+abs(i1/yr*fy)<d1then12$="0" i2%=0 i3$="" goto3310
3240 i%=0 j=fnvk(i3) ifyy%=1orn%then ifj>=-1then ifj<=sgthen i%=-1
3250 ifi%then12$=str$(i3) i3$="" n=sl goto3280
3260 j=fnvk(i3)-1 i3$=str$(j) ifj<=0then i3$=mid$(i3$,2)
3270 i2$=str$(i3/i0*i3) n=sl
3280 i$=i2$ gosub65 i2$=i$ i2%=i% ifi3$=""then3310
3290 ifi2$="1"then i2$="10" goto3310
3300 i2$=i2$+"*10"
3310 l=((len(i2$)-sgn(i2%))*b2+len(i3$)*b2+ef)/pa yw=i1-h2/2/pa
3320 xw=15-l-1.5*t1 b=b2*sf h=h2*sf ifi2$=""then3340
3330 i$=i2$ gosub9000 ifi$=cr$then i=i4 next goto0
3340 e=(h2-h2*ef*el)/pa b=b*ef h=h*ef ifi3$=""then3360
3350 yw=yw+e i$=i3$ gosub9000 yw=yw-e
3351 ifi$=cr$then i=i4 next goto0
3360 next
3365 i$=str$(fnvk(fy)-1) ifleft$(i$,1)=" "then i$=mid$(i$,2)
3370 ifi$="0"then3400
3375 i2$=i$ i$="(*10" b=b2*sf h=h2*sf yw=yw+(1+ef)*h2/pa
3376 i=(y4-yk)*my ifyx<0then yw=i
3377 xw=xw-(len(i$)+1)*b2/pa-len(i2$)*b2*ef/pa ifxw<0thenxw=0
3378 gosub9000 ifi$=cr$then0
3380 ifi2$<>"1"then yw=yw+e b=b*ef h=h*ef i$=i2$ gosub9000 yw=yw-e ifi$=cr$then0
3385 b=b2*sf h=h2*sf i$=")" gosub9000 ifi$=cr$then0
3400 rem ** kontrolle
3402 ifyy%<3then3410
3404 zw=0 wz=zw/180*↑ sw%=1 b=b3*sf h=h3*sf yw=(fnly(y(0))-yk)*my-h3/2/pa xw=0
3406 i$=cy$ gosub9000 ifi$=cr$then i=i4 next goto0
3410 rem ** text
3415 zw=90 wz=zw/180*↑ sw%=1
3420 i$=yy$ l=len(i$)*zb/pa
3421 yw=y3-o2-l xw=(zh*ef*(1-eh)+zh)/pa b=zb*sf h=zh*sf gosub9000
3422 ifi$=cr$then i=i4 next goto0
4000 rem *** werte zeichnen
4005 ifnx<1then5000
4010 zw=0 wz=zw/180*↑ sw%=0 l=(b3+h3)/2 b=i*sf h=b h0=int(l/2/pa+.5)
4012 l=len(xw$) b0=h0*l b1=mx%*h0 h1=mx%*h0
4014 m1=atn(1/l) m2=atn(-1/l)+↑ m3=atn(1/l)+↑ m4=atn(-1/l)+2*↑
4020 l1=-1 forwi=0tonm gosub680 ifwi=0then ifxx%<3then ifyy%<3thenneat
4021 ifsx%=1thensx(1,1)=0 sx(1,2)=0
4022 ifsy%=1thensy(1,1)=0 sy(1,2)=0
4031 i1=x(i) ifxx%=1then i1=fnlx(i1)
4032 i2=y(i) ifyy%=1then i2=fnly(i2)
4033 i3=sx(i,1)-sx(i,1) ifxx%=1then i3=fnlx(i3)
4034 i4=sy(i,1)-sy(i,1) ifyy%=1then i4=fnly(i4)
4035 i5=x(i)+sx(i,2) ifxx%=1then i5=fnlx(i5)
4036 i6=y(i)+sy(i,2) ifyy%=1then i6=fnly(i6)
4038 i1=int(i1-xk)*mx+.5) i2=int(i2-yk)*my+.5) i3=int((i3-xk)*mx+.5)
4039 i4=int(i4-yk)*my+.5) i5=int(i5-xk)*mx+.5) i6=int((i6-yk)*my+.5)
4040 ifmx%<2orl<0then4070
4042 i+(i1-l)=0then j=m2-(sgn(i2-l0)-1)*↑/2 goto4046
4043 i3=(i2-l0)/(i1-l) j=atn(i3) ifi1-l<0then j=j+↑
4044 ifi1-l>0then ifi2-l>0then j=j+2*↑
4045 ifdi>abs(j)then i7=l+h0 i8=l j1=i1-b0 j2=i2 goto4060
4046 ifdi>abs(m2-j)then i7=l i8=l+h0 j1=i1 j2=i2-h0 goto4060
4047 ifdi>abs(m1-j)then i7=l+h0 i8=l j1=i1+b0 j2=i2 goto4060
4048 ifdi>abs(m4-j)then i7=l i8=l+h0 j1=i1 j2=i2+h0 goto4060
4051 ifj>=m4orj<=m1then i7=l+h0 i8=l+h0+i9+l j1=i1+b0 j2=(j1-l)*i9+l
4052 ifj<=m1then ifj<=m2then i8=l+h0 i7=h0/i2+l j2=i2+h0 j1=(j2-l)*i9+l
4053 ifj>=m2then ifj>=m3then i7=l+b0 i8=l+b0+i9+l j1=i1+b0 j2=(j1-l)*i9+l
```

```
4054 if j>=m3theni j<m4theni8=lj-h0:i7=-h0/i9+l1:j2=i2+h0:j1=(j2-lj)/i9+li
4060 lx=i7:ly=i8:xp=j1:yp=j2:gosub10155
4070 xp=i1-b0:yp=i2-h0:i$=p$:gosub9000:li=i1:lj=i2:ifi$=cr$theni=nm:next:goto0
4080 ifsx%=1then4100
4090 ifsx(i,1)thenlx=i3:ly=i2-h1:xp=i3:yp=i2+h1:gosub10155
4091 if0<mx%*(i1-b1-i3)thenlx=i3:ly=i2:xp=i1-b1:yp=i2:gosub10155
4095 if0>mx%*(i1+b1-i5)thenlx=i1+b1:ly=i2:xp=i5:yp=i2:gosub10155
4096 ifsx(i,2)thenlx=i5:ly=i2-h1:xp=i5:yp=i2+h1:gosub10155
4100 ifsy%=1then4120
4110 ifsy(i,1)thenlx=i1-h1:ly=i4:xp=i1+h1:yp=i4:gosub10155
4111 if0<my%*(i2-h1-i4)thenlx=i1:ly=i4:xp=i1:yp=i2-h1:gosub10155
4115 if0>my%*(i2+h1-i6)thenlx=i1:ly=i2+h1:xp=i1:yp=i6:gosub10155
4116 ifsy(i,2)thenlx=i1-h1:ly=i6:xp=i1+h1:yp=i6:gosub10155
4120 next
5000 rem *** funktion
5010 ifmx%<>3then6000
5020 x=x2:gosub1:xp=x4:lx=xp:yp=y:ly=y:ifyy%>1thenyp=fnly(yp):ly=yp
5030 p$="M":if0<mx*(x3-xp)or(xp-x4)*mx>0thenp$="H":print#ap,p$:goto5050
5040 print#ap,p$int((xp-xk)*mx)","int((yp-yk)*my)
5050 s=-dy*10%(sgn(vf%-2)+1)/mx:forxp=xp+stoX3steps:xp=xp:ifxx%>1thenx=10*x
5060 gosub1:yp=y:ifyy%>1thenyp=fnly(y)
5070 dx=xp-lx:dy=yp-ly:i=1/sqr(1+(dy*my/dx/mx)^2):xp=lx+i*dx:yp=ly+i*dy
5080 ifp$="H"thenp$="M":goto5100
5090 p$="D"
5100 if0<mx*(x3-xp)or(xp-x4)*mx>0thenp$="H"
5105 if0<my*(y3-yp)or(yp-y4)*my>0thenp$="H"
5110 geti$:ifi$=cr$thenprint#ap,"H":xp=x3:next:goto0
5120 ifi$<>""thengosub9990:xp=lx:yp=ly:goto5080
5130 print#ap,p$;:ifp$="H"thenprint#ap:next:goto6000
5140 print#ap,int((xp-xk)*mx)","int((yp-yk)*my):lx=xp:ly=yp:next
6000 rem *** markierungen
6010 if0<my%*(y3-aa)or(aa-y4)*my%>0then6050
6020 fori=(x3-xk)*mxto(x4-xk)*mxsteps:lx=i:ly=(aa-yk)*my:xp=i+pl:yp=ly:gosub10
     155:next
6050 if0<mx%*(x3-oa)or(oa-x4)*mx%>0then6999
6060 fori=(y3-yk)*myto(y4-yk)*mysteps:lx=(oa-xk)*mx:ly=i:xp=lx:yp=i+pl:gosub10
     155:next
9999 print#ap,"H":goto0
9000 rem **** txplot
9010 print"M"cl$"M"i$:fd%=0:j0=len(i$):forj=1toj0:n=peek(bb+j-1):nl=peek(bb+j)
9011 ifn=rathenfd%=-1:goto9040
9012 ifn=rbthenfd%=0:goto9040
9020 i%=0:ifn=46theni=fnl>47theni=fnl<58theni%=1:xp=xp-b2*vp:yp=yp-h2/pp/pa
9030 gosub10000:ifi%thenxp=xp-b2/pa+b2*vp:yp=yp+h2/pp/pa
9035 ifi$=cr$thenj=j0
9040 next:return
9990 p$="H":print#ap,p$:pokenk,0
9991 geti$:ifi$=""then9991
9992 return
10000 rem **** chplot
10010 w1=sin(wz):w2=cos(wz):w3=tan(ws)*sw%:c$=c$(n):ifc$=""thenc$=chr$(0)+chr$(
      0)
10020 c$=chr$(mv)+c$+chr$(mv)+chr$(za)+chr$(0):x7=xp:y7=yp:fork9=fd%toc0:forj9=f
      d%toc0
10030 x=int(x7+.5):y=int(y7+.5):ifx<0orx>x8ory<0ory>y8thenp$="H":print#ap,p$:go
      to10050
10040 print#ap,"M"x","y
10050 fori9=1tolen(c$):step2:ifasc(mid$(c$,i9))=mvthenp$="M":i9=i9+1:goto10080
10060 ifp$="H"thenp$="M":goto10080
10070 p$="D"
10080 x=asc(mid$(c$,i9))*b-j9*fd:y=asc(mid$(c$,i9+1))*h-k9*fd:x=x+y*w3
10090 lx=xp:xp=x7+x*w2-y*w1:xp=int(xp+.5)
10100 ly=yp:yp=y7+y*w2+x*w1:yp=int(yp+.5)
10110 ifxp<0orxp>x8ory<0oryp>y8thenp$="H"
10120 geti$:ifi$=cr$thenprint#ap,"H":i9=len(c$):j9=0:k9=0:next:next:next:return
10130 ifi$<>""thengosub9990:i9=i9-2:p$="M":onsgn(i9)+2goto10050,10050,10080
```



```
10140 print#ap,p$;:ifp$="H"thenprint#ap:next:next:next:return
10150 ifvf%=2orp$="M"thenprint#ap,"yp":next:next:next:return
10151 gosub10160:next:next:next:return
10155 lx=int(lx+.5):ly=int(ly+.5):xp=int(xp+.5):yp=int(yp+.5)
10156 print#ap,"M"lx","ly,cr$"D";:ifvf%then10220
10160 ifxp-lx=0thenm=1.7e38:goto10200
10170 m=(yp-ly)/(xp-lx):ifabs(m)>1then10200
10180 c=lx*m-ly:d=sgn(xp-lx)
10190 forx=lxtoxp-1stepd:print#ap,int(x+.5)","int(x*m-c+.5)",";:next:goto10220
10200 c=ly/m-lx:d=sgn(yp-ly)
10210 fory=lytoyp-1stepd:print#ap,int(y/m-c+.5)","int(y+.5)",";:next
10220 print#ap,xp","yp;cr$"M"xp","yp:return
11000 rem **** zeichensatz laden
11001 pokecz,zl/2:print"M"
11010 ifi$=cs$thenifn8>-1then1%=0:return
11020 cs$=i$:open15,8,15:open2,8,2,"0:"+cs$+",s,r":input#15,i,i$,i1,i2:ifi=0the
      n11050
11030 i$(0)=c1$
11040 i$(1)="F"+copy-Fehler2"+str$(i)+" "+i$+str$(i1)+str$(i2)
11050 i%(0)=10:i%(1)=60:s=3:z=peek(cz):gosub12000:ifi$<>cr$then11050
11060 print#15,"i0":input#15,i,i$,i1,i2:ifithen11040
11070 cs$="":close2:close15:pokenk,0:i%=1:return
11080 input#2,i$:ifi$=cc$then11110
11090 i$(0)=c1$
11100 i$(1)="M"+cs$+"M ist keine Zeichensatz-Datei!":goto11050
11110 printc1$:print"MMDatei M"cs$"M wird geladen":fori=0ton8:c$(i)="":next
11120 input#2,n3,za,sf=1/za/pa:forj=0ton3:input#2,l:ifl=0thennext:goto11140
11130 fori=1tol:get#2,c$:c$(j)=c$(j)+left$(c$+chr$(0),1):next:next
11140 i%=0:close2:close15:return
12000 rem **** blinker
12010 j=-1
12020 j=notj:t=ti+i%(-j):pokecz,z:print"M":printtab(s);i$(-j)"M"
12030 geti$:ifi$=""thenonsgn(t-ti)+2goto12020,12020,12030
12040 return
```

```
 1 close#w close15 ifs=then40
 2 rem *** text-plot ausfuehrung ***
 4 cc$="zeichensatz-koordinaten"
 6 sp=39:z1=24 cr$=chr$(13):dc=255 dim c$(dc) ma=.1 x9=3600 y9=2600 ww=6 sc=1.5
 8 bb=32768:nk=158 kb=623:cz=216 cs=198:tu=59468:tm=14:mr=12
10 cl$="" for i=1tosp:cl$=cl$+" " next
12 ll$="":for i=1tosp:ll$=ll$+"m":next
14 poke ts,tm
21 rem steuercodes
22 data147,211,145,209,157,221,135,151
23 read r1, r2, r3, r4, r5, r6, r7, r8
24 rem home clr cnu cno cnr cnl zar zwi
25 data134,198,154,133
26 read ra, rb, rz, re
27 rem fan fau nzs etx
28 mv=255: rem move
34 rem voreinstellungen
35 data 2960,2090,10,10, 0, 0, 4
36 read  x8,  y8,zb,zh,zw,sw,fd
40 print"#"cl$"cont":pokenk,0:gosub50:gosub80 gosub110:gosub120:gosub130
41 gosub140 gosub340:gosub450 goto40
45 rem **** 50-449: subroutinen ****
46 rem ****  fuer abfragen   ****
50 print"◆"cl$"zeichensatz  "cs$"◆"tab(11), input#1$ if i$=cs$then return
53 cs$=i$ open15,8,15 open2,8,2,"0 "+cs$+",s,r" input#15,i,i$,i1,i2 if i=0then58
54 i$(0)=cl$
55 i$(1)="◆◆flokky-fehler◆"+str$(i)+" "+i$+str$(i1)+str$(i2)
56 t1=10:t2=20:gosub350
58 print#15,"i0":input#15,i,i$,i1,i2:if i then53
59 cs$="":close2:close15:pokenk,0:goto50
60 input#2,i$ if i$=cc$then64
63 i$(0)=cl$
64 i$(1)="◆◆cs$◆ ist keine zeichensatz-datei!" goto54
65 print"◆"cl$"◆◆datei ◆"cs$◆ wird geladen":print"◆";
66 input#2,n8,za sf=1/za/pa:for j=0ton8 c$(j)="":input#2,l if l=0thennext goto70
68 for i=1tol get#2,c$:c$(j)=c$(j)+left$(c$+chr$(0),1):next next
70 close2 close15 return
80 print"◆"cl$"◆papierbreite, -hoehe in mm "x8◆pa"◆,"y8◆pa"◆"tab(26);
90 i%=0:input#3,y3 x8=x8/pa:y8=y8/pa
91 if x8>x9thenx8=x9:i%=1
92 if y8>y9theny8=y9:i%=1
93 if i%then80
100 return
110 print"◆"cl$"◆zeichenbreite, -hoehe  "zb"◆,"zh"◆"tab(21);
115 pokenk,1 pokekb,29 input zb,zh b=zb*sf hzh*sf:return
120 print"◆"cl$"◆zeilenwinkel, schreibwinkel  "zw"◆,"sw"◆"tab(25),
125 pokenk,1 pokekb,29 input zw,sw wz=zw/180*t ws=sw/180*t return
130 print"◆"cl$"◆staerke des fettdrucks "fd"◆"tab(22), input fd return
140 print"◆"cl$"◆stiftgeschwindigkeit ◆schnell/◆langsam  s◆"tab(36),
145 input i$:if i$="s"then v%=-1:return
146 if i$="l"then v%=0:return
147 goto140
340 print"◆"cl$"◆1. zeichen auf pos. x,y mm  000,"y8*pa-zh*pa"◆"tab(26),
345 input x7,y7 x7=x7/pa:y7=y7/pa return
350 rem *** blinker ******************
360 j=-1
370 j=not j t=ti+ti+abs(j)*t2:print"◆"i$(abs(j)) print"◆",
380 get i$:if i$<>cr$then onsgn(t-ti)+2goto370,370,380
390 print"◆"cl$"◆",:return
400 print"◆"cl$"◆        *****  auf geht's!  *****" print"◆",:return
450 rem *** warten auf start *********
460 i$(0)=cl$ i$(1)="◆◆ti+t nach li.unten + einsch.,   ◆"return
470 ti=20:t2=40 gosub350 gosub400
500 rem *** ausgabe ****************
510 open#w,sp-x*x7,w=y7:for z=2tozl
520 fd%=0 l=-1 for s=wto0step-1 if week(bb+z*(sp+1)+s)<32then l=s:s=0
530 next get i$ if i$=cr$then gosub990 z=zl next close#w return
535 if i$<>""then gosub990
540 s1=0 for s=0tol if l<0then660
550 n=week(bb+z*(sp+1)+s)
560 if n=1then gosub600 goto660
570 if n=2then gosub625 goto660
580 if n=3then gosub690 goto660
590 if n=4then gosub700 goto660
600 if n=5then gosub710 goto660
610 if n=6then gosub720 goto660
620 if n=7then gosub110 gosub400 goto660
630 if n=8then gosub120 gosub400 goto660
631 if n=9then fd%=-1:goto660
632 if n=bthen fd%=0 goto660
633 if n=zthen gosub50:gosub400 goto660
639 if n=ethen gosub990 s=sp:z=zl next:next close#w return
640 if n>127then660
645 if week(tab+n)and(2^(7-(n and 32)))=0then n=n+64
650 gosub1000 s1=s1+1
660 next:if z<zl then gosub680:gosub690
661 next:if z=zl+1then gosub990
662 close#w return  rem zurueck zum start
670 rem *** subr's stiftbewegungen ***
675 x#=x7 y#=y7 print#w,"M"x#","y# return  rem -> li ob
680 x=-za*s1*b x#=x#+x*cos(wz) y#=y#+x*sin(wz) return  rem -> zl auf
690 x=0 y=-za*h gosub730 return: rem ab
700 x=0 y=za*h gosub730 return  rem auf
710 x=za*b y=0 gosub730:s1=s1+n1:return rem re
720 x=-za*b y=0 gosub730:s1=s1-n1:return rem li
730 s=s+1:n=week(bb+z*(sp+1)+s):n1=val(chr$(n)):if n1=0then n1=1:if n<>48then z=s-1
731 x#=x#+n1*(x*cos(wz)-y*sin(wz)) y#=y#+n1*(y*cos(wz)+x*sin(wz))
732 return  rem n1* in crsr-richtung
990 print#w,"M" close#w print"◆"cl$"◆";:pokenk,0 end gosub400 open#w,w return
1000 rem **** sub chplot ************
1005 w1=sin(wz) w2=cos(wz) w3=tan(ws) c$=c$(n) if c$=""then c$=chr$(0)+chr$(0)
1010 c$=chr$(mv)+c$+chr$(mv)+chr$(za)+chr$(0) x1=x y1=y for k=fd%to0 for j=fd%t
     o0
1015 x=int(x1+.5) y=int(y1+.5):if x<0orx>xBory<0ory>y8then w$="H":print#w,w$ got
     o1030
1020 print#w,"M"x","y
1030 for i=1tolen(c$)step2 if asc(mid$(c$,i))=mvthen w$="M":i=i+1 goto1050
1040 if w$="H"then w$="M":goto1050
1045 w$="D"
1050 k=asc(mid$(c$,i))*b-j*fd y=asc(mid$(c$,i+1))*h-k*fd:x=x+w*w3
1060 lx=x*w:x#=x1+x*w2-y*w1 x#=int(x#+.5)
1090 ly=y*w:y#=y1+y*w2+x*w1 y#=int(y#+.5)
1100 if x<0orx#>8orx<0ory#>y8then w$="H"
1105 get i$ if i$=cr$then gosub990 s=sp z=zl+1 return
1106 if i$<>""then gosub990 i=-2 w$="M" onsgn(i)+2goto1030,1030,1050
1110 print#w,w$, if w$="H"then print#w next next next return
1120 if v%=0orw$="M"then print#w,x#" ,"y# next next next return
1130 if x#=lx=0then m=1.7e38 goto1150
1135 m=(y#-ly)/(x#-lx) if abs(m)>1then1150
1140 c=lx*m-ly d=sgn(x#-1-lx)
1145 for x=lxtox#-1step d print#w,int(x+.5)","int(x*m-c+.5)",", next goto1160
1150 c=ly/m-lx:d=sgn(y#-1-ly)
1155 for y=lytoy#-1step d print#w,int(y/m-c+.5)","int(y+.5)",", next
1160 print#w,x#","y# next next next return
1170 rem gerade von (lx,ly) -> (x#,y#)
1180 rem y=m*(x-lx)+ly    fuer on>m>=1
1190 rem x=1/m*(y-ly)+lx  fuer on>m>1
```

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Jörg Remien danke ich für die Überlassung des Themas, die fortlaufende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, sowie für die anregende und lehrreiche Diskussion während der Abfassung meiner Dissertation.

Für Rat und Beistand in labortechnischen Fragen danke ich Frau Sybille Kirzinger, Frau Eva Lainer, Frau Annegret Landrock, Frau Christina Lemmermann, Frau Iris Reithmeier, Frau Sibylle Schwaiger, Frau Ulrike Schwaiger und Herrn Dr. Johannes Wissmann.

LEBENSLAUF

Am 23. Mai 1950 wurde ich als Sohn des Berufsschullehrers Friedrich Naar und dessen Ehefrau Paula in Traunstein geboren.

Von 1956 bis 1961 ging ich in die Knabenvolksschule in Trostberg. Im Herbst 1961 trat ich in das private altsprachliche Gymnasium in Stein ein und wechselte 1965 in das staatliche, ebenfalls altsprachliche Chiemgau-Gymnasium Traunstein über, wo ich 1970 das Abitur ablegte.

Von Herbst 1970 an studierte ich zunächst 2 Semester Chemie an der Technischen Universität München. Mit dem Wintersemester 1971 begann ich das Studium der Medizin an der Universität München, absolvierte dort 1972 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1975 die Ärztliche Vorprüfung. Die drei Abschnitte der Ärztlichen Prüfung legte ich 1976, 1978 und 1982 ab. Im Mai 1982 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Neben meinem Medizinstudium beschäftigte ich mich weiter mit Chemie und Physik, später mit Statistik und Elektronischer Datenverarbeitung. Im Rahmen meiner Dissertation erwarb ich auch praktische Kenntnisse im Erstellen von Computer-Programmen. Wegen des Wehrdienstes mußte ich 1982/83 meine Arbeit unterbrechen, die ich im laufenden Jahr abschließe.